

REC'D 02 NOV 2004

WIPO PCT



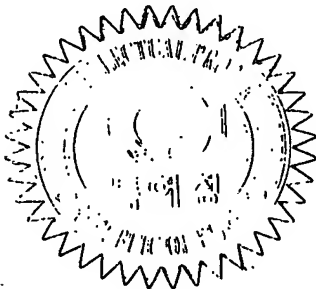
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0072216
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 10월 16일
Date of Application OCT 16, 2003

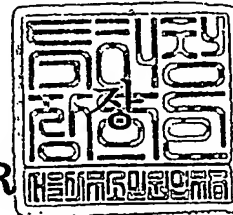
출원인 : 한미약품 주식회사
Applicant(s) HANMI PHARM. IND. CO., LTD.



2004 년 10 월 04 일

특 허 청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.10.16
【발명의 명칭】	대장균 분비서열을 이용하여 항체 단편을 분비·생산하는 발현벡터 및 이를 이용하여 항체 단편을 대량 생산하는 방법
【발명의 영문명칭】	EXPRESSION VECTOR FOR SECRETING AN ANTIBODY FRAGMENT USING E. COLI SIGNAL PEPTIDE AND METHOD FOR THE MASS PRODUCTION OF ANTIBODY FRAGMENT USING SAME
【출원인】	
【명칭】	한미약품 주식회사
【출원인코드】	1-1998-004411-2
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	1999-056327-8
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	1999-023919-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정성엽
【성명의 영문표기】	JUNG, Sung Youb
【주민등록번호】	691121-1047631
【우편번호】	449-755
【주소】	경기도 용인시 죽전동 벽산 3단지 305동 404호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김진선
【성명의 영문표기】	KIM, Jin Sun
【주민등록번호】	750602-1001917



10-9930072216

출력 일자: 2004/10/5

【우편번호】	423-060
【주소】	경기도 광명시 하안동 702 주공아파트 514동 601호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	권세창
【성명의 영문표기】	KWON, Se Chang
【주민등록번호】	630620-1024818
【우편번호】	143-210
【주소】	서울특별시 광진구 광장동 현대8차 802동 2205호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이관순
【성명의 영문표기】	LEE, Gwan Sun
【주민등록번호】	600110-1471553
【우편번호】	138-130
【주소】	서울특별시 송파구 오금동 우창아파트 3동 404호
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10509
【수탁일자】	2003. 10. 02
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10510
【수탁일자】	2003. 10. 02
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10511
【수탁일자】	2003. 10. 02
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10512

【수탁일자】	2003. 10. 02
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10513
【수탁일자】	2003. 10. 02
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10516
【수탁일자】	2003. 10. 02
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	36
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이현실 (인) 대리인 장성구 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	43 면 43,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	38 항 1,325,000 원
【합계】	1,397,000 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 대장균 분비서열을 이용하여 항체 단편을 분비·생산하는 발현벡터 및 이를 이용하여 항체 단편을 대량 생산하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체 또는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합된 항체 단편 유전자를 대장균에서 수용성 이형접합체 형태로 발현·분비할 수 있는 재조합 발현벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 미생물 및 상기 미생물을 이용하여 항체 단편을 대량으로 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 발현벡터는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체 또는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열을 이용하여 항체 단편을 항원 결합능을 갖는 수용성 이형접합체의 형태로 숙주세포의 원형질막 주위공간 또는 배양 배지로 발현·분비시킴으로써 회수가 용이하고 대량 생산이 가능하기 때문에 진단 시약의 제조 또는 치료용 항체의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 9



【명세서】

【발명의 명칭】

대장균 분비서열을 이용하여 항체 단편을 분비·생산하는 발현벡터 및 이를 이용하여 항체 단편을 대량 생산하는 방법{EXPRESSION VECTOR FOR SECRETING AN ANTIBODY FRAGMENT USING E. COLI SIGNAL PEPTIDE AND METHOD FOR THE MASS PRODUCTION OF ANTIBODY FRAGMENT USING SAME}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 중쇄와 경쇄의 불변영역이 각각 클로닝된 플라스미드 pBH 및 pBL의 제작과정을 나타낸 것이고,

도 2는 플라스미드 pBH 및 pBL에 각각 중쇄와 경쇄의 가변영역이 삽입된 플라스미드 pBHC 및 pBLC의 제작과정을 나타낸 것이고,

도 3은 T7 프로모터와 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합된 경쇄 유전자 단편을 포함하는 발현벡터 pmsLC와 중쇄 유전자 단편을 포함하는 발현벡터 pmsHC의 제작과정을 나타낸 것이고,

도 4는 중쇄와 경쇄가 하나의 T7 프로모터에 의해 조절되어 분비·발현되는 다이-시스템 발현벡터 psDLHF_B 및 psDLHF-Bp의 제작과정을 나타낸 것이고,

도 5는 Tac 프로모터와 대장균의 세포외막 단백질 A (OmpA) 분비서열에 융합된 중쇄 및 경쇄 유전자 단편을 포함하는 발현벡터 poDLHF의 제작과정을 나타낸 것이고,

도 6은 중쇄와 경쇄 유전자 단편이 각각 독립된 Tac 프로모터에 의해 분비·발현되는 발현벡터 poDLHF_B/S의 제작과정을 나타낸 것이고,



도 7은 경쇄 유전자 단편은 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되고, 중쇄 유전자 단편은 대장균의 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합되어 Tac 프로모터에 의해 분비·발현되는 발현벡터 pmsDLHF_N/S의 제작과정을 나타낸 것이고,

도 8은 경쇄 유전자 단편은 대장균의 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합되고, 중쇄 유전다 단편은 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되어 Tac 프로모터에 의해 분비·발현되는 발현벡터 pmsDLHF_S/K의 제작과정을 나타낸 것이고,

도 9는 대장균 형질전환체로부터 발현된 항-중양 피사인자- α Fab'의 발현 양상을 환원 조건 및 비-환원조건의 SDS-PAGE에서 비교한 결과이고,

도 10은 대장균 형질전환체로부터 발현된 항-중양 피사인자- α Fab'가 중양 피사인자- α 와 결합하는지 여부를 활성효소 면역측정 분석법 (ELISA)으로 확인한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<11> 본 발명은 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체 또는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합된 항체 단편 유전자를 대장균에서 수용성 이형접합체 형태로 발현·분비할 수 있는 재조합 발현벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 미생물 및 상기 미생물을 이용하여 항체 단편을 대량으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

12> 일반적으로 천연 항체는 2개의 동일한 경쇄 (light chain) 및 2개의 동일한 중쇄 (heavy chain)로 구성되는 약 150 kDa의 이형사합체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 이황화 (disulfide) 공유결합에 의해 중쇄에 연결되지만, 이황화 결합의 수는 면역글로불린 아형 (immunoglobulin isotype)의 중쇄들에 따라 달라진다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 쇠내에 규칙적으로 위치하는 이황화 브리지 (bridge)를 가지며, 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V_H) 및 상기 도메인에 이어진 다수의 불변 도메인 (C_{H1})을 갖는다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에는 가변 도메인 (V_L)을, 다른 쪽 말단에는 불변 도메인 (C_K)을 갖는다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인과 함께 정렬되어 있으며, 경쇄의 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 함께 정렬되어 있다. 특별한 아미노산 잔기가 경쇄와 중쇄의 가변 도메인 사이에 인터페이스를 형성시키는 것으로 여겨진다.

13> '가변성'은 가변 도메인의 특정한 부위가 항체들 사이에서 광범위한 서열 상이성을 나타내는 것을 의미하며, 특정 항체와 그의 대응 항원의 결합 및 특이성을 나타내는 것이다. 그러나, 이러한 가변성은 항체의 가변 도메인에 고르게 분포되어 있는 것이 아니라 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에 있어서 초가변영역이라 불리는 3개의 세그먼트에 집중되어 있으며, 가변 도메인 중 보다 고도로 보존된 부분을 프레임워크 영역 (FR, framework region)이라고 부른다. 천연의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 주로 베타-시트 (β -sheet) 형태를 취하며 3개의 초가변영역으로 연결되어 있는 4개의 FR을 포함하는데, 상기 FR은 루프 연결 또는 베타-시트 구조를 형성한다. 각 쇠에서의 초가변영역은 FR에 의해 서로 밀접하게 유지되어 있고, 다른 쇠로부터의 초가변영역은 항체의 항원-결합부위 형성에 도움이 된다 (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5th Ed, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1991).



- 14> '항체 단편'은 바람직하게는 항원 결합영역 또는 그의 가변영역을 포함하는, 항체의 일부를 의미하는 것이다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 scFv 단편 등이 있다. 항체를 파파인 (papain)으로 절단하면 Fab 단편으로 불리는 두 개의 동일한 항원-결합 단편 (각각 단일한 항원 결합부위를 가짐)과 나머지 Fc 단편이 생성된다. 반면, 항체에 펩신 (pepsin)을 처리하면 이가 항원-결합부위를 가지며 항원과 여전히 가교결합을 형성할 수 있는 F(ab')₂ 단편을 생성시킨다. Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 포함하는 것이고, Fab' 단편은 Fab 단편과 달리 항체 힌지 (hinge) 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복실 말단에 수 개의 잔기가 부가되어 있다.
- 15> 항원 결합능력을 증가시키거나 항원성을 변형시키고 이중 특이적 항체를 제조하는 등의 항체의 고유한 성질을 변화시키기 위해 유전자 재조합 방법을 통한 항체와 항체 단편의 생산이 이루어지고 있다. 항원 결합능을 보유한 항체를 생산하기 위하여 초기에는 동물세포를 발현체계로 이용한 사례들이 보고되었는데, 미국특허 제4816567호에는 경쇄와 중쇄 유전자를 각각 발현벡터에 클로닝한 후 상기 두 발현벡터를 동물세포에 형질전환시켜 동시 발현시킴이 예시되어 있다. 이외에도 곤충세포를 이용한 베클로바이러스 발현체계 (Haseman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3942-3946, 1990), 효모 발현체계 (Horwitz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8678-8682, 1988), 람다 파아지를 이용한 조합 라이브러리 (Huse et al., *Science* 246: 1275-1281, 1989), 나 필라멘티스 파아지 (McCafferty et al., *Nature* 348: 552-554, 1990) 등을 이용하여 항체 일부를 생산하는 방법이 보고된 바 있다.
- 16> 이러한 연구의 일환으로 대장균 (*E. coli*) 발현체계를 이용한 항체와 항체 단편을 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 대장균의 발현체계를 이용한 생산방법은 기존의 동물세포를 이용한 방법에 비해 여러 가지 장점이 있는데, 이들을 대상으로 한 유전자 조작기술

은 많은 연구자들에 의해 비교적 잘 알려져 있어 쉽게 발현백터를 제작하여 발현여부를 빨리 검증할 수 있으며, 대장균은 성장속도가 매우 빠르기 때문에 저렴한 비용으로 대량생산이 가능하여 연구용 시료 확보 측면에서 유리할 뿐만 아니라 비교적 단순한 발효방법을 적용할 수 있어 상업적 이용 측면에서도 다른 숙주세포를 이용하는 것보다 용이하다.

- 17> 항체 유전자를 대장균에 형질전환하여 발현시킨 사례는 여러 문헌에서 보고되었으며 (Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3273-3277, 1984, Boss et al., *Nucleic Acids Res.* 12: 3791-3806, 1984), 이들 문헌에서는 항체 분자들이 다양한 수율로 발현되어 세포질 내에 존재함을 보고하였다. 또한, 대장균을 숙주세포로 사용하여 면역글로불린의 경쇄를 분비·발현시키고 (Zemel-Dreassen et al., *Gene* 315-322, 1984), 항체 단편 유전자들을 알카라인 포스파테이즈 (alkaline phosphatase) 혹은 베타 락타메이즈 (β -lactamase) 분비서열과 융합시켜 대장균의 원형질막 주위공간 (periplasmic space)으로 분비시킬 수 있음이 보고된 바 있다 (Pluckthun et al., *Cold Spring Harbor Symposiua on Quantitative Biology* Volume LII, 105-112, 1987). 국제출원 공개 제W0 92/01059호에서는 암세포의 특정 부위를 인식하는 항체의 Fab' 유전자를 대장균의 세포외막 단백질 A (OmpA) 분비서열에 융합시켜 발현시킨 바 있으며, 미국특허 제5648237호에서는 PhoA 프로모터를 이용하여 암세포의 특정 부위를 인식하는 항체의 Fab' 유전자를 대장균의 엔테로톡신 분비서열에 융합시켜 발현시킬 수 있음을 명시하였다.

- 18> 항체 단편은 천연 항체와 유사한 항원 결합능을 보유하지만 천연 항체와 달리 그 크기가 작기 때문에 국소 침투가 좋은 것으로 알려져 있으며 (Blumenthal et al.,



Adv. Drug Del. Rev. 4: 279, 1990), Fc 영역을 포함하고 있지 않기 때문에 인체에 투여시 작용기 기능에 의한 부작용을 유발하지 않는다는 장점이 있다. 따라서, 이러한 항체 단편으로 진단 시약을 제조하거나 치료용 항체로 개발할 때 이들을 대장균에서 대량으로 발현시키는 것은 경제적인 측면에서 매우 유리할 것으로 판단된다. 그러나, 항체 단편을 천연 항체로부터 제작하는 경우에는 천연 항체를 단백질 분해효소로 절단한 후 정제과정을 거쳐야하는 번거로움이 있다.

- 19> 반면, 항체 단편을 대장균에서 생산하는 경우에는 다음과 같은 문제점이 있다. 먼저, 모든 항체 단편이 치료 혹은 진단의 목적을 충족할 만큼의 양으로 발현되지 않아 경우에 따라서는 여러 번의 배양과정을 거쳐야 한다. 또한, 항체 단편이 기능적으로 활성을 갖기 위해서는 하나의 세포 내에서 중쇄와 경쇄가 모두 발현되어 이들이 이황화 결합을 통해 이형접합체의 형태를 유지해야 하므로, 단백질을 대장균에서 과발현시키는 경우 흔하게 나타나는 현상인 봉입체 형태로 항체 단편을 발현하는 것이 아니라 수용성이 우수한 형태로 발현시켜야 한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 분비서열 (signal peptide)을 이용하여 항체 단편을 원형질막 주위공간으로 분비시켜 생산하는 방법에 대한 연구가 진행되어 왔다. 그러나, 분비서열을 이용하여 항체 단편을 생산할 때 분비서열에 융합된 모든 항체 단편이 대장균의 원형질막 주위공간으로 과발현되는 것은 아니며, 또한 발현시키고자 하는 항체의 유전자 서열 (단백질 서열)에 따라 발현의 유무 내지 발현되는 항체 단백질의 양에 많은 차이를 나타낸다. 예를 들어, PhoA 프로모터에 대장균 엔테로톡신 분비서열을 사용하여 인간 표피 성장인자 수용체 2의 세포밖 영역에 대해 하이브리도마 (hybridoma)를 이용하여 생산한 단일클론 항체의 Fab 유전자를 융합시켜 발현시켰을 때와 그것의 인간화 항체를 동일한 벡터 체계를 사용하여 발현시켰을 때 그 발현량은 10배에서 100배까지 차이가 있음이 보고되었다 (Kelly et, al.



Biochemistry 31: 5434-5441, 1992). 또한, M13 파아지의 분비서열을 사용하여 항체 단편을 발현시키는 경우 분비서열의 아미노산 서열의 차이에 따라 그 발현양은 50% 이상 차이를 보이며 (Humphreys et, al. *Protein Expression and Purification* 26: 309-320, 2002), 동일한 발현체계 (프로모터, 분비서열, 목적 항체 유전자 단편)에서도 발현벡터 구조 유전자의 차이 혹은 중쇄 유전자와 경쇄 유전자 사이의 거리 등에 따라서도 그 발현 양상에 많은 차이가 나타나 이 보고된 바 있다 (국제특허 공개 제W00194585호). 이러한 사실들을 통하여 특정 항체 단편을 발현시키기 위해서는 발현시키려는 목적 항체 유전자 서열과 발현에 필요한 구조 유전자간의 상호작용, 그리고 분비서열을 이용할 경우 분비서열간의 상호작용이 조화를 잘 이루어야 함을 알 수 있다.

- 20> 이에 본 발명자들은 항체 단편을 대장균에서 항원 결합능력을 갖는 수용성 이형접합체의 형태로 과발현시키기 위해 예의 연구 노력한 결과, 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체와 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열을 이용하여 목적 항체 단편인 종양 괴사인자-알파 (TNF- α)의 인간 항체 Fab'를 배양 배지로 분비·발현시킬 수 있는 재조합 발현벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 미생물 및 상기 형질전환 미생물의 고농도 발효를 통해 항체 단편을 대량으로 생산하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 21> 본 발명의 목적은 대장균 분비서열을 이용하여 항체 단편을 항원 결합능을 갖는 수용성 이형접합체 형태로 과발현시킬 수 있는 재조합 발현벡터 및 상기 발현벡터로 형질전환된 미생물을 제공하는 것이다.

- 22> 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 미생물을 이용하여 항체 단편을 대량으로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- 23> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 대장균 분비서열에 항체 단편의 경쇄 및 중쇄 유전자를 융합시켜 항체 단편을 배양 배지로 분비·생산하는 재조합 발현벡터 및 이를 포함하는 형질전환 미생물을 제공한다.
- 24> 또한, 본 발명은 상기 형질전환 미생물을 배양한 후 배양 배지로 분비·생산된 항체 단편을 분리·정제하는 단계를 포함하는, 항체 단편의 대량 생산방법을 제공한다.
- 25> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- 26> 본 발명은 대장균 분비서열에 항체 단편의 경쇄 및 중쇄 유전자를 융합시켜 항체 단편을 배양 배지로 분비·생산하는 재조합 발현벡터 및 이를 포함하는 형질전환 미생물을 제공한다.
- 27> 이를 위하여, 본 발명은 항체 단편의 인간 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자 일부를 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체 또는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열과 융합시켜 기능적으로 천연 항체와 유사한 항체 단편을 분비·생산할 수 있는 재조합 발현벡터 및 이를 포함하는 형질전환 미생물을 제조한다.
- 28> 본 발명에서 항체 단편은 Fab, Fab' F(ab')₂ 또는 scFv일 수 있으며, 바람직하게는 Fab'이다. Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 포함하는 것이고, Fab' 단편은 항체 힌지 (hinge) 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메

인의 카르복실 말단에 수 개의 잔기가 부가되어 있는 것이다. 또한 F(ab')₂는 두 분자의 Fab'이 이황화 결합 혹은 화학적 반응을 통해 결합한 것이고, scFv는 경쇄와 중쇄의 가변 영역만이 펩타이드 링커 (peptide linker)에 의해 연결되어 단일 폴리펩타이드 쇄 형태로 존재하는 것이다.

- 29> 본 발명의 항체 단편으로 선택될 수 있는 것은 항원에 선택적으로 결합할 수 있는 것을 포함하는데, 이때 항원은 T-세포, 내피세포 혹은 암세포 마커와 같이 세포의 표면에 결합되어 있는 항원이거나 세포와 결합되어 있지 않은 수용성 항원일 수 있다. 세포 표면에 결합되어 있는 항원으로는 β 1 인테그린 (integrins), P-셀렉틴 (P-selectin), E-셀렉틴, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CD69, MHC 클래스 I, II, VEGF, 및 그 외 수용체 등이 포함되며, 수용성 항원으로는 IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 그리고 IL-12 같은 인터루킨들과 싸이토메갈로 바이러스 항원과 같은 바이러스 항원, IgE와 같은 면역글로불린, 인터페론-알파, 베타, 감마와 같은 인터페론 등이 포함되며, 또한 세포의 성장 및 분화에 영향을 미치는 인자들, 예를 들면 종양 괴사인자-알파, 베타, 혈소판 유래 성장인자-알파, 베타 (platelet derived growth factor-alpha, beta) 등이 포함된다. 본 발명의 바람직한 실시예서는, 이에 한정되는 것은 아니나, 항-종양 괴사인자-알파 (TNF- α)의 경쇄 및 중쇄 유전자 단편을 사용한다. 종양 괴사인자-알파는 단구세포나 대식세포와 같은 면역관련 세포들에 의해 생성되어 과다 발현시 염증을 유발하는 사이토카인으로 알려져 있는 IL-1, IL-6 및 IL-8의 생성을 유도하며, 연골조직을 파괴하는 단백질 분해효소의 분비를 촉진하여 관절염을 일으키는 주된 매개체로 알려져 있다. 관절염 치료제로서의 항-종양 괴사인자-알파 항체의 Fab' 유전자는 단일클론 항체로부터 유래되어야 하며, 바람직하게는 인간화 항체, 더 바람직하게는 완전한 인간 항체로부터 유래되어야 한다.

- 30> 몇몇의 종양 피사인자-알파의 키메릭 항체 혹은 인간화 항체의 상보성 결정부위 (complementarity determining region, CDR) 영역 유전자가 이미 보고되어 있으며, 완전한 인간 항체의 유전자 서열도 보고되어 있다 (국제특허공개 제W097/29131호). 따라서, 이들 문헌의 유전자 서열을 참고하여 전체 항체 유전자 서열의 단편을 뉴클레오티드 합성기로 인공적으로 합성하여 일련의 어닐링 (annealing)과 라이게이션 (ligation) 과정을 통해 Fab의 중쇄와 경쇄를 클로닝할 수 있으며, 라이게이션 사슬반응 (LCR, ligation-chain reaction)과 중합효소 연쇄반응 (PCR, polymerase chain reaction)을 통해서도 클로닝할 수 있다.
- 31> 본 발명의 바람직한 실시예에서는 서열번호 1 내지 6으로 기재되는 염기서열을 갖는 인간 항-종양 피사인자-알파 Fab'의 경쇄 가변영역 단편들과 서열번호 7 내지 12로 기재되는 염기서열을 갖는 중쇄 가변영역 단편들을 뉴클레오티드 합성기로 합성한 후 PCR을 통해 이들이 하나로 연결된 경쇄 및 중쇄 가변영역을 제조한다. 또한, 사람의 혈액으로부터 추출한 전체 RNA를 주형으로 하고 인간 항-종양 피사인자-알파 Fab'의 경쇄 및 중쇄 불변영역에 특이적인 시발체 쌍을 이용한 RT-PCR을 수행하여 경쇄 불변영역과 IgG1의 CH1과 힌지 영역을 포함하는 중쇄 불변영역을 포함하는 유전자 단편을 얻는다. 이와 같이 준비된 경쇄 및 중쇄 가변영역과 불변영역을 서로 연결하여 이들을 포함하는 플라스미드 pBLC 및 pBHC를 제조한다 (도 1 및 2 참조). 염기서열 분석 결과, 상기 플라스미드 pBLC 및 pBHC에 삽입된 경쇄와 중쇄는 각각 서열번호 32 및 33으로 기재되는 염기서열을 갖는 것으로 확인되었다.
- 32> 발현시키고자 하는 항체 단편은 중쇄와 경쇄로 구성된 두 종류의 서로 다른 단백질간의 이형접합체로서 존재한다. 따라서, 항체 단편이 활성형의 이형접합체 단백질로서 항원 결합능을 갖기 위해서는 두 종류의 중쇄와 경쇄가 동시에 비슷한 수준으로 발현되어야 하며 발현된 중쇄와 경쇄간에 정확한 위치에서 이황화 결합이 형성되어야 한다. 또한, 항체 단편을 대장균



에서 발현시킬 때 대장균 세포질 내에서의 발현은 봉입체 형태로 존재할 수 있는데, 이럴 경우 중쇄와 경쇄의 이황화 결합이 원하는 위치에서 생성되지 않을 가능성이 높으며, 수용성 상태로 존재한다 하더라도 정제시 세포를 완전히 파쇄해야 하는 어려움이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 대장균의 분비서열을 이용하여 항체 단편을 대장균의 원형질 주위 공간 혹은 배양 배지로 발현시키는 재조합 발현백터를 제공한다.

<33> 이와 같이 대장균에서 발현된 산물이 배양 배지에 존재할 경우에는 세균의 균체 내에 존재할 때처럼 세균을 파쇄해야 하는 번거로움을 피할 수 있으며, 발현산물이 원형질막 주위공간에 존재하므로 균체를 수거한 후 삼투압 쇼크와 같은 공정없이 이를 수득할 수 있다. 뿐만 아니라 이황화 결합에 의해 이형접합체를 형성하는 단백질에 있어서 산화적 환경이 이황화 결합을 용이하게 하는데, 이런 면에 있어서도 발현산물이 세균의 세포질 내에 존재하는 것 보다 원형질막 주위공간 혹은 배양 배지에 존재하는 것이 유리하다.

<34> 본 발명의 재조합 발현백터에 사용될 수 있는 대장균의 분비서열로는 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열, 세포외막 단백질 A 분비서열, 베타 락타메이즈 분비서열, Gene III 분비서열, 펠리 분비서열 또는 이들의 변이체 등이 있으며, 이에 한정되는 것은 아니지만, 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체와 세포외막 단백질 A 분비서열이 바람직하다.

<35> 본 발명의 바람직한 실시예에서 활성형태의 항체 단편 Fab'을 배양 배지로 과발현시키기 위해 사용한 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체는 대장균에서 여러 이종 단백질을 분비·발현시키기 위해 본 발명자들에 의해 개발된 것으로



서열번호 17로 기재되는 염기서열을 가지며, 상기의 분비서열을 이용하여 대장균에서 다양한 이중 단백질을 최적의 효율로 분비·발현시킬 수 있음이 보고된 바 있다 (대한민국 특허 제 316347호). 본 발명은 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체 또는 세포외막 단백질 A 분비서열에 항체 단편의 중쇄와 경쇄를 각각 연결하여 활성을 지닌 Fab'가 배양 배지로 분비·생산하는 재조합 발현백터를 제공한다.

<36> 이러한 재조합 발현백터로서 본 발명은 중쇄와 경쇄를 하나의 발현백터에서 발현시키기 위해, 하나의 프로모터 하에 두 개의 단백질을 적절한 간격을 두어 배치하여 동시에 발현시키는 다이-시스트로닉 체계 (di-cistronic system)를 이용하는 재조합 발현백터와 각각의 독립된 프로모터에 중쇄와 경쇄를 연결하여 독립적으로 이들을 발현시키는 이중-프로모터 체계 (dual-promoter system)를 이용하는 재조합 발현백터를 제공한다.

<37> 먼저, 본 발명은 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체와 인간 성장호르몬 유전자를 포함하는 발현백터인 pT14S1SH-4T20V22Q (대한민국 특허 제316347호)에서 인간 성장호르몬 유전자 부위를 제거한 후 플라스미드 pBLC로부터 얻은 경쇄 유전자 단편과 플라스미드 pBHC로부터 얻은 중쇄 유전자 단편을 삽입하여 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합된 중쇄 유전자 단편을 포함하는 발현백터 pmsHC 및 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합된 경쇄 유전자 단편을 포함하는 발현백터 pmsLC를 제작한다. 중쇄와 경쇄가 하나의 프로모터에 의해 조절되어 분비·발현되는 다이-시스트로닉 발현백터를 제작하기 위해, 플라스미드 pmsHC로부터 PCR을 통해 얻은 중쇄 유전자 단편을 플라스미드 pmsLC에 삽입하여 발현백터 psDLHF_B 및 psDLHF_Bp를 제조한다 (도 3 및 4 참조).



- 38> 또한, 본 발명은 상기와 같은 방법에 의해 Tac 프로모터와 대장균 세포외막 단백질 A (OmpA) 분비서열 (서열번호 24)에 연결된 중쇄 및 경쇄 유전자 단편을 포함하는 발현벡터 poDLHF를 제작한다 (도 5 참조).
- 39> 상기 발현벡터 psDLHF_B, psDLHF_Bp 및 poDLHF는 각각의 분비서열에 융합된 항-종양 괴사인자-알파의 중쇄와 경쇄가 하나의 프로모터에 의해 분비·발현되는 다이-시스트로닉 발현벡터이다. 상기 발현벡터 각각을 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켜 제조한 대장균 형질전환체 BL21(DE3)/psDLHF_B(HM10920), BL21(DE3)/psDLHF_BP(HM10921) 및 BL21/poDLHF(HM10922)를 한국 미생물보존센터 (KCCM)에 2003년 10월 2일자로 기탁하였다 (기탁번호: KCCM-10509, KCCM-10510 및 KCCM-10511).
- 40> 전술한 바와 같이 하나의 프로모터에서 두 개의 서로 다른 단백질을 분비 발현시킬 경우 프로모터에서 가까운 단백질과 먼 단백질의 발현율은 차이가 있을 수 있다 (Humphreys et, al. *Protein Expression and Purification* 26: 309-320, 2002). 이에, 본 발명은 항-종양 괴사인자-알파 Fab'의 중쇄와 경쇄 유전자가 각각의 독립된 프로모터에 의해 분비·발현되는 이중-프로모터 발현체계를 이용한 발현벡터를 제공한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 OmpA 분비서열에 융합된 항-종양 괴사인자-알파 Fab'의 중쇄 및 경쇄 유전자 단편이 각각 Tac 프로모터에 의해 독립적으로 분비·발현이 조절되는 발현벡터 poDLHF_B/S를 제작한다 (도 6 참조). 상기 발현벡터 poDLHF_B/S로 대장균 BL21을 형질전환시켜 제조한 대장균 형질전환체 BL21/poDLHF_B/S(HM10923)을 한국미생물보존센터 (KCCM)에 2003년 10월 2일자로 기탁하였다 (기탁번호: KCCM-10512).
- 41> 또한, 항체 단편 같은 이형접합체의 경우 어느 한 단백질의 발현이 많아서 목적산물을 얻을 수 없으며 이들이 서로 비슷한 수준으로 발현되어야 한다. 이에, 본 발명에서는 중쇄와



경쇄 유전자에 서로 다른 분비서열을 융합시켜 항체 단편을 분비·발현시킬 수 있는 재조합 발현벡터를 제공한다.

<42> 본 발명의 바람직한 실시예에서는 항-종양 괴사인자-알파 Fab'의 경쇄 유전자는 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되고 중쇄 유전자는 OmpA 분비서열에 융합되어 하나의 T7 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 발현벡터 pmsDLHF_N/S를 제작한다 (도 7 참조). 또한, 본 발명은 항-종양 괴사인자-알파 Fab'의 중쇄 유전자는 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되고 경쇄 유전자는 OmpA 분비서열에 융합되어 하나의 Tac 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 발현벡터 pmsDLHF_S/K를 제작한다 (도 8 참조). 상기 발현벡터 pmsDLHF_N/S 및 pmsDLHF_S/K 각각을 대장균 BL21에 형질전환시켜 제조한 대장균 형질전환체 BL21/pmsDLHF_N/S(HM10924) 및 BL21/pmsDLHF_S/K(HM10925)를 한국미생물보존센터 (KCCM)에 2003년 10월 2일자로 기탁하였다 (기탁번호: KCCM-10513 및 KCCM-10516).

<43> 본 발명은 상기와 같이 제작된 재조합 발현벡터를 적당한 숙주세포에 형질전환시킨 재조합 미생물을 제공한다. 상기에서 적당한 숙주세포로는 대장균 W3110, RV308, BL21, BL21(DE3) 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 대장균 BL21이다. 상기 벡터들로 형질전환된 재조합 미생물을 발효기를 이용하여 고농도로 배양 ($OD_{600}=120$ 내지 150)할 경우 항-종양 괴사인자-알파 항체 단편은 배양 배지 1 l 당 100 내지 500 mg 이상의 높은 수율로 배양 배지로 분비·생산됨을 확인하였다 (표 1 참조). 이렇게 대량 생산된 항-종양 괴사인자-알파 항체 단편은 단백질-G 친화성 컬럼을 통해 부분 정제할 수 있으며, 정제된 항-종양 괴사인자-알파 항체 단편을 환원조건의 SDS-PAGE와 비-환원조건의 SDS-PAGE로 확인한 결과, 항체 단편이 수용성 이형접합체 형태로 형성되었음을 확인하였다 (



도 9 참조). 또한, 결합 항원인 종양 괴사인자-알파로 코팅한 활성효소 면역측정 분석법 (ELISA)을 통해 대장균 형질전환체로부터 생산한 항-종양 괴사인자-알파의 항체 단편이 종양 괴사인자-알파 항원에 대해 우수한 결합능을 가짐을 알 수 있었다 (도 10 참조).

<44> 아울러, 본 발명은 대장균 분비서열에 융합된 항체 단편의 경쇄 및 중쇄 유전자를 포함하는 발현벡터를 제작하고, 상기 발현벡터로 형질전환된 미생물을 배양하여 항체 단편을 배지 내로 분비·생산하는 것을 포함하는, 항체 단편의 대량 생산방법을 제공한다.

<45> 상기에서 대장균 분비서열은 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열, 세포외막 단백질 A 분비서열, 베타 락타메이즈 분비서열, Gene III 분비서열, 펠리 분비서열 또는 이들의 변이체인 것이 바람직하고, 서열번호 17로 기재되는 염기서열을 갖는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체 또는 서열번호 23으로 기재되는 염기서열을 갖는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열을 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

<46> 우선, 상기에서 각각의 재조합 발현벡터로 형질전환된 미생물을 적당한 배지에 전배양한 후 전배양액을 발효기에 접종하여 30 내지 35℃에서 호기조건을 유지하면서 본배양을 실시한다. 흡광도 600에서 OD값이 80이 되는 시기에 유도물질 (inducer)을 첨가하여 항체 단편의 발현을 유도하는데, 유도물질로는 이에 한정되는 것은 아니지만 IPTG가 바람직하다. 이를 흡광도 600에서 OD값이 120 내지 140이 되도록 40 내지 45시간 동안 더 배양한다. 상기 배양액을 원심분리하여 상층액을 분리한 후 이를 친화 크로마토그래피 컬럼 등에 걸어 항체 단편을 정제한다. 상기에서 형질전환 미생물은 대장균 BL21(DE3)/psDLHF_B(HM10920) (KCCM-10509), BL21(DE3)/psDLHF_BP(HM10921) (KCCM-10510), BL21/poDLHF(HM10922) (KCCM-10511), BL21/poDLHF_B/S(HM10923) (KCCM-10512), BL21/pmsDLHF_N/S(HM10924) (KCCM-10513) 또는 BL21/pmsDLHF_S/K(HM10925) (KCCM-10516)인 것이 바람직하다.



- <47> 본 발명을 통해 발현된 항체 단편은 숙주세포의 원형질막 주위공간 또는 배양 배지로 분비되기 때문에 균체를 파쇄하거나 균체를 수거한 후 삼투압 쇼크와 같은 공정을 거치지 않고 용이하게 목적 산물을 회수할 수 있다.
- <48> 본 발명을 통해 발현될 수 있는 목적 항체 단편, 바람직하게는 Fab, Fab' F(ab')₂, scFv는 항-종양 괴사인자-알파의 항체 단편에 국한되는 것은 아니며, 진단을 목적으로 하거나 또는 치료용으로 쓰일 수 있는, 예를 들면 항암의 효과가 있는 암 항체의 항체 단편, 과다 발현되어 인체에 치명적인 해를 끼치는 여러 사이토카인에 대한 항체 단편 등의 생산에 적용될 수 있다.
- <49> 전술한 바와 같이, 본 발명의 재조합 발현벡터는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체 또는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열을 이용하여 항체 단편을 항원 결합능을 갖는 수용성 이형접합체의 형태로 숙주세포의 원형질막 주위공간 또는 배양 배지로 발현·분비시킴으로써 회수가 용이하고 대량 생산이 가능하기 때문에 진단 시약의 제조 또는 치료용 항체의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.
- <50> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- <51> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <52> <실시예 1> 항-종양 괴사인자-알파 Fab' 유전자의 클로닝

<53> 국제특허 제W097/29131호에 기재된 서열을 참고로 인간 항-종양 괴사인자-알파 Fab'의 중쇄와 경쇄의 가변영역을 뉴클레오티드 합성기를 이용하여 합성하였다. 경쇄 가변영역 클로닝을 위한 유전자 단편은 서열번호 1 내지 6의 염기서열을 가지며, 중쇄 가변영역 클로닝을 위한 유전자 단편은 서열번호 7 내지 12의 염기서열을 갖는다. 이 후의 클로닝 과정을 용이하게 하기 위해 각 쇄 유전자의 첫 번째 유전자 단편 (즉, 서열번호 1 및 7)에 각각 HindIII 및 PuvI 제한효소 인식부위를 삽입하였다. 상기에서 합성한 각 쇄의 유전자 단편들을 한 튜브에 섞은 후 통상의 PCR 방법을 통해 각각의 유전자 단편들을 하나의 유전자 서열로 만들어 경쇄 및 중쇄 가변영역을 제조하였다. 상기 PCR 반응에서는 유전자 단편들이 서로 주형이면서 시발체로 작용하여 어닐링 (annealing)되고 이로부터 약 320 mer 정도의 단편이 형성된다. PCR 반응은 각각의 유전자 단편 100 pmole, 5 μ l의 2 mM dNTP 혼합액, 2.5 단위의 pfu DNA 중합효소 (Stratagen사) 및 5 μ l의 pfu 반응 완충용액 (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl)을 포함하는 반응 혼합물에 증류수를 가하여 최종 부피를 50 μ l로 맞춘 후 온도 순환기 (DNA thermocycler, Perkin-Elmer사)를 이용하여 94℃에서 5분 동안 예비 변성시킨 후, 94℃에서 60초, 60℃에서 60초, 72℃에서 60초의 반응을 30회 수행하였다.

<54> 인간 항-종양 괴사인자-알파 Fab'의 경쇄 불변영역과 IgG1의 CH1과 힌지 영역을 포함한 중쇄 불변영역을 클로닝하기 위해 사람의 혈액에서 수득한 혈구 세포의 RNA를 주형으로 하여 다음과 같은 RT-PCR을 수행하였다. Qiaamp RNA blood 키트 (Qiagen사)를 사용하여 약 6 ml의 혈액에서 전체 RNA를 수득한 후 이 RNA를 주형으로 하고 중쇄 유전자 증폭을 위해서는 서열번호 13 및 14로 기재되는 시발체 쌍을, 경쇄 유전자 증폭을 위해서는 서열번호 15 및 16으로 기재되는 시발체 쌍을 이용하는 One-Step RT-PCR 키트 (Qiagen사)를 사용하여 각 쇄의 유전자를 증폭하였다. 이때, 이 후의 클로닝 과정을 용이하게 하기 위해 서열번호 26의 중쇄 5'-시

발체에는 HindIII 및 StuI 제한효소 인식부위를, 서열번호 27의 3'-시발체에는 종결 코돈을 포함한 BamHI 제한효소 인식부위를 삽입하였으며, 서열번호 28의 경쇄 5'-시발체에는 HindIII 및 NruI 제한효소 인식부위를, 서열번호 29의 3'-시발체에는 종결 코돈을 포함한 BamHI 제한효소 인식부위를 삽입하였다. 이로부터 증폭된 중쇄 및 경쇄의 불변영역 산물을 각기 HindIII와 BamHI으로 절단한 후 동일한 제한효소로 처리된 플라스미드 pBluscript SK(-) (Stratagen사)에 삽입하여 플라스미드 pBH 및 pBL을 제조하였다 (도 1). DNA 염기서열 분석을 통하여 플라스미드 pBH 및 pBL에 각각 중쇄 및 경쇄의 불변영역이 정확히 삽입되었음을 확인하였다.

<55> 중쇄 및 경쇄의 가변영역과 불변영역을 연결하기 위해, 상기에서 PCR로 합성한 각 쇄의 가변영역을 각각 HindIII 제한효소로 절단한 후 중쇄 가변영역은 제한효소 HindIII/StuI으로 처리된 플라스미드 pBH에 삽입하였고, 경쇄 가변영역은 제한효소 HindIII/NruI으로 처리된 플라스미드 pBL에 삽입하여 중쇄 및 경쇄의 가변영역과 불변영역이 연결된 플라스미드 pBHC 및 pBLC를 제작하였다 (도 2). 상기 플라스미드 pBHC 및 pBLC에 각각 삽입된 중쇄와 경쇄는 각각 서열번호 32 및 33으로 기재된 염기서열을 갖는다.

<56> <실시예 2> 항-종양 피사인자-알파 Fab' 유전자 발현벡터의 제작

<57> <2-1> 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체 및 항-종양 피사인자-알파 Fab' 유전자를 포함하는 발현벡터의 제작

<58> 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체를 이용한 발현벡터를 제작하기 위해 본 발명자들에 의해 개발된 인간 성장호르몬 발현벡터인 pT14S1SH-4T20V22Q (대한민국 특허 제 316347호)를 사용하였다. 상기 발현벡터는



서열번호 17로 기재되는 염기서열을 갖는 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체를 포함한다. 이 발현벡터에 클로닝된 인간 성장호르몬 유전자를 제거하고 그 부위에 상기 실시예 1에서 제작한 중쇄 및 경쇄 유전자 단편을 삽입하기 위해, pT14S1SH-4T20V22Q 플라스미드의 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체와 인간 성장호르몬 유전자의 융합 부위에 서열번호 18 및 19의 시발체 쌍을 사용한 특정 부위 치환 돌연변이법 (site-directed mutagenesis)을 수행하여 StuI 제한효소 인식부위를 삽입하였으며 염기서열 분석법을 통해 정확히 StuI 제한효소 인식부위가 생성되었음을 확인하였다. pT14S1SH-4T20V22Q 플라스미드에 StuI 제한효소 인식부위가 생성된 플라스미드를 pmSTII로 명명하였다.

<59> 이와 같이 제작된 플라스미드 pmSTII에 StuI/BamHI 제한효소를 처리한 후 아가로즈 겔에 전기영동을 수행하여 인간 성장호르몬 부위는 제거되고 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체를 포함하는 큰 단편 (4.7 kb)을 회수하였다. 상기 실시예 1에서 제작한 경쇄 유전자 단편이 삽입되어 있는 플라스미드 pBLC를 PuvI 제한효소로 절단한 뒤 T4 DNA 중합효소를 사용하여 양 말단을 평할 말단으로 만들었다. 여기에 다시 BamHI 제한효소를 처리하여 약 720 bp의 경쇄 유전자 단편을 회수하였다. 또한, 중쇄 유전자 단편이 삽입되어 있는 플라스미드 pBHC를 주형으로 하고 서열번호 1 및 20의 시발체 쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다. 이로부터 증폭된 PCR 산물에 상기 경쇄 유전자 단편의 제조에 사용된 동일한 효소들을 처리하여 약 700 bp의 중쇄 유전자 단편을 회수하였다. 이때, 서열번호 20의 시발체는 중쇄의 힌지 영역 일부를 포함한 힌지의 변형된 서열인 E-P-K-S-C-D-K-T-H-T-C-A-A-종결코돈이 중쇄 유전자 단편에 삽입될 수 있게 고안되었고 BamHI 제한효소 인식부위를 포함하고 있어서 이 후 Fab' 발현벡터의 제작에 유용하게 사용될 수 있다. 이와 같이 준비된 중쇄 및 경쇄 유전자 단편을 각각 인간 성장호르몬 부위가 제거된 pmSTII 플라스미드 단편에 삽입하여 열안정성 엔테로톡신 분비서



열 변이체에 융합된 중쇄 유전자 단편을 포함하는 발현벡터 pmsHC 및 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합된 경쇄 유전자 단편을 포함하는 발현벡터 pmsLC를 제작하였다 (도 3).

360> 중쇄와 경쇄가 하나의 프로모터에 의해 조절되어 분비·발현되는 다이-시스트로닉 발현벡터를 제작하기 위해, 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체와 융합된 중쇄 유전자 단편을 포함하는 플라스미드 pmsHC를 주형으로 하고 서열번호 21 및 20의 시발체 쌍과 서열번호 22 및 23의 시발체 쌍을 사용하여 PCR 증폭을 시도하였다. 서열번호 21의 5'-시발체는 중쇄 유전자 단편을 발현하기 위해 필요한 샤인-달가노 (Shine-Dalgarno, SD) 서열부터 PCR 반응이 진행될 수 있게 고안되었으며, 증폭된 산물을 용이하게 클로닝하기 위해 BamHI 제한효소 인식부위를 포함하고 있다. 또한,



서열번호 22 및 23의 시발체 쌍은 서열번호 21 및 20의 시발체 쌍과 동일한 염기서열을 가지고 있으나, 단지 클로닝 부위를 다르게 하기 위해 BamHI이 아닌 BpuI 제한효소 인식부위를 포함하고 있다. 각 시발체 쌍을 이용하여 증폭된 중쇄 유전자 단편들 (하나는 BamHI 제한효소 인식부위를 포함하고 다른 하나는 BpuI 제한효소 인식부위를 포함)을 각각 BamHI과 BpuI 제한효소로 절단하였다. 한편, 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합된 경쇄 유전자 단편을 포함하는 플라스미드 pmsLC에서 BamHI과 BpuI 제한효소 인식부위는 모두 경쇄 유전자의 종결 코돈 하류에 위치하지만 BpuI의 제한효소 인식부위가 BamHI보다 약 60 뉴클레오티드 이상 하류에 존재한다. 상기 플라스미드 pmsLC를 각기 BamHI과 BpuI 제한효소로 절단한 후 그 부위에 상기에서 준비된 BamHI 또는 BpuI 제한효소 처리 중쇄 유전자 단편을 삽입하였다. 플라스미드 pmsLC의 BamHI 제한효소 자리에 중쇄 유전자 단편이 삽입된 Fab' 발현벡터를 psDLHF_B라 명명하였고, 플라스미드 pmsLC의 BpuI 제한효소 자리에 중쇄 유전자 단편이 삽입된 Fab' 발현벡터를 psDLHF_Bp라 명명하였다 (도 4). 이들 발현벡터들은 하나의 T7 프로모터에 의해 각각 대장균 엔테로톡신 분비서열에 융합된 중쇄 및 경쇄 유전자를 발현할 수 있다. 상기 발현벡터 각각을 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21(DE3)/psDLHF_B(HM10920) 및 BL21(DE3)/psDLHF_BP(HM10921)을 제조하였고, 이들을 한국미생물보존센터 (KCCM)에 2003년 10월 2일자로 기탁하였다 (기탁번호 KCCM-10509 및 KCCM-10510).

<61> <2-2> 대장균 세포외막 단백질 A (OmpA) 분비서열 및 항-중양 피사인자-알파 Fab' 유전자를 포함하는 발현벡터의 제작



- <62> 대장균 세포외막 단백질 A (OmpA) 분비서열 (서열번호 24)을 이용하여 항-중양 피사인자-알파의 중쇄 및 경쇄 유전자 단편을 분리·발현할 수 있는 발현벡터를 하기와 같이 제작하였다
- <63> 먼저, Tac 프로모터와 OmpA 분비서열을 포함하는 플라스미드 pFlag.CTS (이스트만사)를 제한효소 HindIII로 절단한 후 이 후의 클로닝 과정을 용이하게 하기 위해 클레노우 DNA 중합 효소 (Klenow DNA polymerase, NEB, New England Biolab USA)를 사용하여 HindIII 제한효소 인식부위를 평활 말단으로 만든 뒤 BglIII 제한효소로 절단하여 5'-말단은 평활 말단, 3'-말단은 접착 말단을 가진 벡터 단편을 제조하였다. 또한, OmpA 분비서열과 중쇄 및 경쇄 유전자 단편을 연결하기 위해서, 중쇄 유전자 단편을 함유한 실시예 1의 플라스미드 pBHC를 주형으로 하고 서열번호 25 및 26의 시발체 쌍을 이용한 PCR 증폭을 수행하여 중쇄의 가변영역과 불변영역, 그리고 변형된 힌지 서열과 종료 코돈이 포함된 산물을 증폭하였다. 이때, 3'-말단에 해당되는 서열번호 26의 시발체는 BglIII 제한효소 인식부위를 삽입하도록 고안되었다. 이렇게 증폭된 중쇄 유전자 단편 산물을 제한효소 BglIII로 절단한 후 이 단편을 상기에서 BglIII로 절단된 플라스미드 pFlag.CTS에 삽입하여 OmpA 분비서열에 융합된 중쇄 유전자 단편을 포함하는 플라스미드 poHC를 제작하였다. 이와 동일한 방법으로 경쇄 유전자 단편을 함유한 실시예 1의 플라스미드 pBLC를 주형으로 하고 서열번호 27 및 28의 시발체 쌍을 이용한 PCR 증폭을 수행한 후 동일한 제한효소 처리과정을 거쳐 플라스미드 pFlag.CTS에 삽입하여 OmpA 분비서열에 융합된 경쇄 유전자 단편을 포함하는 플라스미드 poLC를 제작하였다.
- <64> 각각 OmpA 분비서열에 융합된 중쇄와 경쇄 유전자가 하나의 Tac 프로모터에 의해 조절되어 분리·발현되는 다이-시스트로닉 발현벡터를 제조하기 위해, 상기에서 제작된 플라스미드 poHC를 주형으로 하고 제한효소 SalI의 인식부위를 포함하는 서열번호 29 및 30의 시발체 쌍



을 사용하여 PCR을 수행하였다. 이로부터 증폭된 PCR 산물은 양쪽 말단에 SalI 제한효소 인식 부위를 가지며 프로모터를 제외한 중쇄의 발현에 필요한 샤인-달가노 서열과 OmpA 분비서열 등을 가지고 있다. 증폭된 산물을 제한효소 SalI으로 절단한 후 유전자 단편을 회수하고 동일한 제한효소로 절단한 플라스미드 poLC에 삽입하여 Fab' 유전자를 발현하는 발현벡터 poDLHF를 제작하였다 (도 5). 상기 발현벡터 poDLHF로 대장균 BL21을 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21/poDLHF(HM10922)를 제조하였고, 이를 한국미생물보존센터 (KCCM)에 2003년 10월 2일자로 기탁하였다 (기탁번호: KCCM-10511).

<65> <2-3> 이중 프로모터 (dual-promoter)에 의해 조절되는 발현벡터의 제작

<66> 항-중양 피사인자-알파 Fab'의 중쇄와 경쇄 유전자가 각각의 독립된 프로모터에 의해 분비·발현되도록 이중-프로모터 발현시스템을 이용하는 발현벡터를 하기와 같이 제작하였다. OmpA 분비서열에 융합된 항-중양 피사인자-알파 Fab'의 중쇄 유전자 단편이 삽입되어 있는 실시예 <2-2>의 플라스미드 poHC를 제한효소 BamHI과 SalI으로 절단하였다. 이를 아가로즈 겔에 전기영동을 걸어 Tac 프로모터와 OmpA 분비서열, 그리고 항-중양 피사인자-알파 Fab'의 중쇄 유전자 단편을 포함하는 보다 작은 단편 (1.2 kb)을 회수한 후 클레노우 DNA 중합효소를 이용하여 양 말단을 평활 말단으로 만들었다. 또한, 항-중양 피사인자-알파 Fab'의 경쇄 유전자 단편이 삽입되어 있는 실시예 <2-2>의 플라스미드 poLC를 제한효소 SalI으로 절단한 뒤 상기와 동일하게 클레노우 DNA 중합효소를 이용하여 평활 말단으로 만들었다. 여기에 상기에서 준비된 중쇄 유전자 단편을 삽입하여 OmpA 분비서열에 융합된 경쇄 및 중쇄 유전자가 독립적으로 Tac 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 발현벡터 poDLHF_B/S를 제작하였다 (



도 6). 상기 발현벡터 poDLHF_B/S로 대장균 BL21을 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21/poDLHF_B/S(HM10923)를 제조하였고, 이를 한국미생물보존센터 (KCCM)에 2003년 10월 2일자로 기탁하였다 (기탁번호: KCCM-10512).

<67> <2-4> 각 쇄가 서로 다른 분비서열에 의해 분비·발현되는 발현벡터의 제작

<68> <2-4-1>

<69> 항-중양 피사인자-알파 Fab'의 경쇄 유전자는 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되고 중쇄 유전자는 OmpA 분비서열에 융합되어 하나의 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 발현벡터를 하기와 같이 제작하였다.

<70> 각 쇄가 OmpA 분비서열에 융합되어 하나의 Tac 프로모터에 의해 발현되도록 제작된 실시예 <2-2>의 발현벡터 poDLHF를 제한효소 NdeI과 SacI으로 절단한 뒤 아



가로즈 겔에 전기영동을 수행하여 보다 큰 유전자 단편 (6.6 kb)을 회수하였다. 제한효소 NdeI의 인식부위는 OmpA 분비서열 첫 번째 아미노산인 메싸이오닌에 위치하며 제한효소 SacI의 인식부위는 경쇄 유전자의 불변영역에 위치하기 때문에 상기 제한효소로 절단하면 OmpA 분비서열과 경쇄의 가변영역 전부, 그리고 경쇄의 불변영역 일부가 제거된 유전자 단편을 회수할 수 있다. 한편, 중쇄 유전자 단편이 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합된 플라스미드인 pmsLC를 주형으로 하고 제한효소 NdeI 인식부위를 포함하며 열안정성 엔테로톡신 분비서열의 첫 번째 아미노산부터 결합하는 서열번호 31의 5'-시발체와 제한효소 SacI 인식부위를 포함하는 서열번호 20의 3'-시발체를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 이로부터 증폭된 유전자 산물을 제한효소 NdeI과 SacI으로 절단한 후 상기에서 경쇄 부분이 제거된 플라스미드 poDLHF에 삽입하여 발현벡터 pmsDLHF_N/S를 제작하였다 (도 7). 상기 발현벡터 pmsDLHF_N/S를 대장균 BL21에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21/pmsDLHF_N/S(HM10924)를 제조하였고, 이를 한국미생물보존센터에 2003년 10월 2일자로 기탁하였다 (기탁번호: KCCM-10513).

<71> <2-4-2>

<72> 상기 실시예 <2-4-1>과는 달리 항-중양 피사인자-알파 Fab'의 중쇄 유전자는 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되고 경쇄 유전자는 OmpA 분비서열에 융합되어 하나의 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 발현벡터를 하기와 같이 제작하였다.

<73> 상기 실시예 <2-1>의 발현벡터 psDLHF_Bp를 제한효소 SacI과 KpnI으로 절단한 후 아가로즈 겔에 전기영동하여 작은 유전자 단편 (0.6 kb)을 회수하였다. 제한효소 SacI의 인식부위는 경쇄의 불변영역에 존재하며 제한효소 KpnI의 인식부위는 중쇄의 불변영역에 존재하기 때문에



회수한 유전자 단편은 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합된 경쇄 유전자 단편을 포함하고 있다. 각 쇄가 OmpA 분비서열에 연결되어 하나의 Tac 프로모터에 의해 발현되도록 제작된 실시예 <2-2>의 발현벡터 poDLHF를 동일한 제한효소인 SacI과 KpnI으로 절단한 후 아가로스 겔에 전기영동하여 크기가 큰 유전자 단편 (7.4 kb)을 회수하였으며, 이를 상기에서 회수한 경쇄 유전자 단편과 연결하여 발현벡터 pmsDLHF_S/K를 제작하였다 (도 8). 상기 발현벡터 pmsDLHF_S/K를 대장균 BL21에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21/pmsDLHF_S/K(HM10925)를 제조하였고, 이를 한국미생물보존센터 (KCCM)에 2003년 10월 2일자로 기탁하였다 (기탁번호 : KCCM-10516).

<74> <실시예 3> 항-중양 피사인자-알파 Fab' 유전자의 발현

<75> 상기 실시예 2에서 수득한 미생물 형질전환체 HM10920 내지 HM10925를 5 l 규모의 발효기 (Marubishi)에 접종하여 발효시킨 후 각각의 항-중양 피사인자-알파 Fab' 유전자의 발현유무를 확인하였다.

<76> 먼저, LB 배지 100 ml에 상기 형질전환체들을 각각 밤새 진탕 배양한 후 발효기에 접종하여 본배양을 진행하였다. 발효기의 온도는 35℃ 혹은 30℃를 유지하였으며 혐기성 상태로 가는 것을 방지하기 위해 공기를 20 vvm으로 투입하였고 500 rpm으로 교반하였다. 발효가 진행됨에 따라 미생물의 성장을 위해 부족한 에너지원은 포도당 (glucose)과 효모 추출액 (yeast extract)을 미생물의 발효 상태에 따라 투여하였고, 흡광도 600 nm에서 OD값이 80이 되는 시기에 유도물질 (inducer)인 IPTG를 투여하여 발현을 유도하였다. 이를 40 내지 45시간 동안 배양하여 흡광도 600 nm에서 OD값이 120 내지 140이 되도록 고농도로 배양하였다.

<77> 상기 발효액을 원심분리 (20,000 g, 30분)하여 침전물은 버리고 상층액을 취하여 다음과 같은 활성효소 면역측정 분석법 (ELISA)을 통해 각각의 형질전환체로부터 발현되는 항-종양 괴사인자-알파 Fab'의 양을 측정하였다. 인간 항체 CH1에 대한 단일클론 항체 (MAB1304, Chemicon international)를 10 mM 카보네이트 완충용액 (pH 9.6)에 1 μ g/ml의 농도로 준비한 후 웰당 200 ng의 양으로 96웰 플레이트에 4℃에서 밤새 코팅한 후 PBS-T (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.05% 트윈 20) 용액으로 3번 세척하였다. 소 혈청 알부민을 1%의 농도로 PBS-T 용액에 용해시켜 준비한 차단 (blocking) 완충용액 250 μ l를 각 웰에 점적한 뒤 상온에서 1시간 동안 방치하고 동일한 PBS-T 용액으로 3번 세척하였다. 표준액과 시료를 적당한 농도로 PBS-T 용액으로 희석한 후 항체가 코팅된 웰에 점적하여 상온에서 1시간 동안 방치시켜 반응시킨 후 다시 PBS-T 용액으로 3번 세척하였다. 표준액으로 사용한 시료는 사람 면역 글로불린-G (아이비-글로불린 에스, 녹십자 PBM)을 단백질 분해효소인 파파인으로 절단하여 일련의 컬럼을 통해 정제한 Fab이며 PBS-T 용액에 1 ng/ml의 농도로 준비한 후 두 배씩 희석하여 사용하였다. 컨쥬게이트는 사람의 경쇄 불변영역에 대한 다중클론 항체에 퍼옥시다제가 공유결합된 시료 (A7164, Sigma사)를 차단 완충용액에 1000 : 1로 희석하여 사용하였으며, 이를 각 웰에 200 μ l씩 점적한 후 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 각 웰을 PBS-T 용액으로 3번 세척한 후 발색용액 A와 B (칼라-A-안정화 퍼옥시다제 [Color A-Stabilized peroxide] 용액 및 칼라 B-안정화 크로모젠 [Color B-stabilized chromogen] 용액, DY 999, R&D Systems사)를 반반 섞어 각 웰에 200 μ l씩 첨가하고 30분간 방치하였다. 그 후에 반응 정지용액인 2 M 황산을 50 μ l씩 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응이 완료된 시료는 마이크로플레이트 판독기 (Molecular Device사)로 450 nm 파장에서 표준액과 검액의 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.



78> 【표 1】

형질전환체	발현벡터	발현 양 (mg/ℓ, 배양 배지내)
HM10920 (KCCM-10509)	psDLHF_B	80
HM10921 (KCCM-10510)	psDLHF_Bp	100
HM10922 (KCCM-10511)	poDLHF	250
HM10923 (KCCM-10512)	poDLHF_B/S	30
HM10924 (KCCM-10513)	pmsDLHF_N/S	500
HM10925 (KCCM-10516)	pmsDLHF_S/K	80

79> <실시예 4> 발현 단백질의 확인

80> <4-1> SDS-PAGE

81> 상기 실시예 3에서 각각의 대장균 형질전환체로부터 발현된 항-종양 피사인자-알파 Fab'를 확인하기 위하여 Fab에 강한 친화성이 있다고 알려진 단백질-G 컬럼을 사용하여 하기와 같은 방법으로 부분 정제 후 SDS-PAGE에 전기영동을 수행하였다.

82> 하이트랩 단백질 G HP (Hitrap Protein G HP, Amersham Bioscience사)에 10 볼륨의 평형 완충용액 (20 mM 인산 나트륨, pH 7.0)을 분당 1 ml의 유속으로 흘려주어 충분히 평형화시킨 후 상기 실시예 3에서 수득한 발효 상층액을 컬럼에 점적하였다. 시료의 점적이 끝난 후 다시 10 볼륨의 평형 완충용액으로 컬럼을 세척한 후 5 볼륨의 용출용액 (0.1 M 글리신-HCl pH 2.7)을 흘려 컬럼에 결합되어 있는 항-종양 피사인자-알파 Fab'를 수득하였다.

83> 상기와 같이 수득된 항-종양 피사인자-알파 Fab'는 중쇄와 경쇄 두 종류의 전혀 다른 단백질이 이황화 결합에 의해 결합되어 있는 이형접합체 형태이기 때문에 환원조건의 SDS-PAGE와

비-환원조건의 SDS-PAGE에서의 단백질의 이동양상이 다르게 나타난다. 도 9는 상기와 같이 정제된 Fab'를 15% 크라이테리온 겔 (criterion gel, Bio-Rad사)을 사용하여 비-환원상태의 SDS-PAGE 겔과 환원상태의 SDS-PAGE 겔에 전개시켜 그 이동양상을 비교한 것이다. 도 9의 레인 2 및 3은 환원조건에서 SDS-PAGE 겔에 전개한 것이고, 레인 4 및 5는 비-환원조건에서 SDS-PAGE 겔에 전개한 것이다. 레인 1은 전염색 저-범위 표준 단백질 마커 (prestained low-range standard marker, Bio-Rad사)이고, 레인 2 및 4는 실시예 3에서 사용한 Fab 표준 단백질이고, 레인 3 및 5는 상기에서 제조한 형질 전환체 HM10922 (KCCM-10511)를 발효시켜 얻은 정제 시료이다.

34> 도 9에 나타난 바와 같이, 환원조건의 SDS-PAGE에서는 중쇄와 경쇄의 결합이 환원되어 이들이 각각 단량체로 존재하기 때문에 단량체의 크기만큼 이동한 반면 (이때, 중쇄의 분자량은 약 24 kDa이고 경쇄의 분자량은 23 kDa으로 두 쇠의 분자량 차이가 작기 때문에 겔에서는 하나의 분자처럼 보인다.), 비-환원조건의 SDS-PAGE에서는 중쇄와 경쇄가 이황화 결합으로 연결된 이형접합체 형태로 존재하여 약 47 kDa의 이동거리를 가짐을 확인하였다.

35> <4-2> N-말단 서열 확인

36> 상기 실시예 <4-1>의 SDS-PAGE를 통해 확인된 약 47 kDa의 이형접합체 단백질의 아미노산 서열을 확인하기 위해 기초과학 지원연구소 서울 분소에 상기 단백질의 N-말단 서열 분석을 의뢰하였으며, 분석할 시료는 하기와 같이 준비하였다.

37> 먼저, PVDF 막 (Bio Rad사)을 메탄올에 약 2-3초간 담구어 활성화시킨 후 차단 완충용액 (170 mM 글리신, 25 mM Tris·HCl (pH 8), 20% 메탄올)에 충분히 적셔주었다. 실시예 <4-1>에



서 전개된 비-환원조건의 SDS-PAGE 겔을 상기와 같이 준비된 PVDF 막에 블롯팅 키트 (Hoefer Semi-Dry Transfer unit, Amersham)를 이용하여 1시간 가량 블롯팅을 수행하였다. PVDF 막으로 이동된 단백질을 단백질 염색약인 쿠마시블루 R-250 (Amresco사)으로 3-4초간 염색한 후 탈색용액 (물 : 아세트산: 메탄올이 5 : 1 : 4)으로 세척하였다. 세척이 끝난 막에서 단백질이 포함되어 있는 부위를 가위로 절단하여 N-말단 서열 분석을 의뢰하였다.

- <88> 항-종양 괴사인자-알파 Fab' 경쇄 단백질의 서열은 Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser (서열번호 34)이며 중쇄의 단백질 서열은 Glu-Val-Gln-Leu-Glu-Val-Asp-Ser (서열번호 35)이다. 아미노산 서열 분석 결과, 본 발명의 대장균 형질전환체로부터 분리·발현되어 정제된 약 47 kDa의 이형접합체 단백질의 N-말단은 Asp/Glu-Ile/Val-Gln-Met/Leu-Thr/Val-Gln/Asp-Ser (서열번호 36)의 서열을 갖는 것으로 확인되었으며, 이러한 결과는 본 발명에 따라 대장균에서 생산한 항-종양 괴사인자-알파 Fab'의 경쇄와 중쇄가 정상적인 이형접합체 형태로 존재함을 재확인시켜 주는 것이다.

<89> <4-3> 활성 효소 면역 측정 (ELISA)

- <90> 상기 실시예 3에서 대장균 형질전환체로부터 발현된 항-종양 괴사인자-알파 Fab'가 종양 괴사인자-알파 항원과 결합하는지 여부를 확인하기 위해 하기와 같이 활성효소 면역측정 분석법 (ELISA)을 수행하였다.

- <91> 먼저, 상기 실시예 <4-1>에서 수득한 Fab'의 농도를 280 nm 파장의 흡광계수 (extinction coefficient=1.43, Humphreys et, al. *Protein Expression and Purification* 26: 309-320, 2002)를 이용해 계산한 후 PBS-T 완충용액에 10 ng/ml의 농도로 용해시켰다. 또한,



중양 피사인자-알파와 결합하는 표준항체로서 현재 중양 피사인자-알파와 결합하여 관절염 치료제로 상업적 효능을 입증 받은 휴미라 (humira, Abbott사)를 동일한 완충용액을 사용하여 동일한 농도로 제조하였다. 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 ELISA를 수행하여 중양 피사인자-알파를 웰에 코팅한 후 동일한 농도에서 동물세포에서 생산한 표준항체와 본 발명의 대장균 형질전환체에서 생산한 Fab'가 동일한 결합능을 보이는지를 알아보았다. 이때, 실시예 3에서 사람 면역 글로불린-G를 단백질 분해효소인 파파인으로 절단한 후 일련의 컬럼을 통해 정제한 Fab를 표준 단백질 (대조군)로 사용하였다.

- 92> 도 10에 나타난 바와 같이, 대조군으로 사용한 Fab 표준 단백질은 중양 피사인자-알파에 결합능을 전혀 나타내지 않았지만, 본 발명에 따라 대장균 형질전환체에서 생산된 항-중양 피사인자-알파 Fab'은 희석 배수와 비례하게 중양 피사인자-알파와 결합하였고, 표준항체와 동일하거나 또는 더 높은 흡광도를 나타냄을 확인하였다.

【발명의 효과】

- 93> 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 재조합 발현벡터는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체 또는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열을 이용하여 항체 단편을 항원 결합능을 갖는 수용성 이형접합체의 형태로 숙주세포의 원형질막 주위공간 또는 배양 배지로 발현·분비시킴으로써 회수가 용이하고 대량 생산이 가능하기 때문에 진단 시약의 제조 또는 치료용 항체의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

대장균 분비서열에 융합된 항체 단편의 경쇄 및 중쇄 유전자를 포함하는 발현벡터를 제작하고, 상기 발현벡터로 형질전환된 미생물을 배양하여 항체 단편을 배지 내로 분비·생산하는 것을 포함하는, 항체 단편의 대량 생산방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

항체 단편이 키메라, 인간화 또는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서,

항체 단편이 Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 scFv인 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 4】

제 1항에 있어서,

대장균 분비서열이 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열, 세포외막 단백질 A 분비서열, 베타 락타메이즈 분비서열, Gene III 분비서열, 펠비 분비서열 및 이들의 변이체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 5】

제 4항에 있어서,



대장균 분비서열이 서열번호 17로 기재되는 염기서열을 갖는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체 또는 서열번호 23으로 기재되는 염기서열을 갖는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열인 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 6】

제 5항에 있어서,

항체 단편의 경쇄 및 중쇄 유전자가 각각 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되고 하나의 프로모터에 의해 발현·분비가 조절되는 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 7】

제 5항에 있어서,

항체 단편의 경쇄 및 중쇄 유전자가 각각 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합되고 하나의 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 8】

제 5항에 있어서,

항체 단편의 경쇄 유전자는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되고 항체 단편의 중쇄 유전자는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합되어 하나의 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 9】

제 5항에 있어서,

항체 단편의 경쇄 유전자는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합되고 항체 단편의 중쇄 유전자는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되어 하나의 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 10】

제 6항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서,
프로모터가 T7 또는 Tac 프로모터인 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 11】

제 1항에 있어서,
항체 단편이 항-종양 괴사인자-알파 (anti-tumor necrosis factor-alpha, anti-TNF- α)인 것을
특징으로 하는 생산방법.

【청구항 12】

제 1항에 있어서,
발현벡터가 psDLHF_B, psDLHF_Bp, poDLHF, pmsDLHF_N/S 및 pmsDLHF_S/K로 구성된 군으로부터
선택되는 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 13】

제 1항에 있어서,
미생물이 대장균인 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 14】

제 13항에 있어서,

대장균 BL21(DE3)/psDLHF_B(HM10920) (KCCM-10509), BL21(DE3)/psDLHF_BP(HM10921) (KCCM-10510), BL21/poDLHF(HM10922) (KCCM-10511), BL21/poDLHF_B/S(HM10923) (KCCM-10512), BL21/pmsDLHF_N/S(HM10924) (KCCM-10513) 및 BL21/pmsDLHF_S/K(HM10925) (KCCM-10516)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 생산방법.

【청구항 15】

대장균 분비서열에 융합된 항체 단편의 경쇄 및 중쇄 유전자를 포함하고 항체 단편을 배양 배지로 분비·생산하는 발현벡터.

【청구항 16】

제 15항에 있어서,

항체 단편이 키메릭, 인간화 또는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 17】

제 15항에 있어서,

항체 단편이 Fab, Fab' F(ab')₂ 또는 scFv인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 18】

제 15항에 있어서,

대장균 분비서열이 대장균의 열안정성 엔테로톡신 분비서열, 세포외막 단백질 A 분비서열, 베타 락타메이즈 분비서열, Gene III 분비서열, 펠리 분비서열 및 이들의 변이체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.



【청구항 19】

제 18항에 있어서,

대장균 분비서열이 서열번호 17로 기재되는 염기서열을 갖는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체 또는 서열번호 23으로 기재되는 염기서열을 갖는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 20】

제 19항에 있어서,

항체 단편의 경쇄 및 중쇄 유전자가 각각 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되고 하나의 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 21】

제 20항에 있어서,

항체 단편이 항-종양-피사인자 알파 단편인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 22】

제 21항에 있어서,

항-종양 피사인자-알파의 경쇄 및 중쇄 유전자가 각각 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되고 하나의 T7 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

**【청구항 23】**

제 22항에 있어서,

발현벡터가 psDLHF_B 또는 psDLHF_Bp인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 24】

제 19항에 있어서,

항체 단편의 경쇄 및 중쇄 유전자가 각각 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합되고 하나의 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 25】

제 24항에 있어서,

항체 단편이 항-종양-괴사인자 알파 단편인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 26】

제 25항에 있어서,

항-종양 괴사인자-알파의 경쇄 및 중쇄 유전자가 각각 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합되고 하나의 Tac 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 27】

제 26항에 있어서,

발현벡터가 poDLHF인 것을 특징으로 하는 발현벡터.



【청구항 28】

제 19항에 있어서,

항체 단편의 경쇄 유전자는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되고 항체 단편의 중쇄 유전자는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합되어 하나의 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 29】

제 28항에 있어서,

항체 단편이 항-종양-괴사인자 알파 단편인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 30】

제 29항에 있어서,

항-종양 괴사인자-알파의 경쇄 유전자는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되고 중쇄 유전자는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합되어 하나의 Tac 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 31】

제 30항에 있어서,

발현벡터가 pmsDLHF_N/S인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 32】

제 19항에 있어서,



항체 단편의 경쇄 유전자는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합되고 항체 단편의 중쇄 유전자는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되어 하나의 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 33】

제 32항에 있어서,

항체 단편이 항-종양-괴사인자 알파 단편인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 34】

제 33항에 있어서,

항-종양 괴사인자-알파의 경쇄 유전자는 대장균 세포외막 단백질 A 분비서열에 융합되고 중쇄 유전자는 대장균 열안정성 엔테로톡신 분비서열 변이체에 융합되어 하나의 Tac 프로모터에 의해 분비·발현이 조절되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 35】

제 34항에 있어서,

발현벡터가 pmsDLHF_S/K인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 36】

제 15항의 발현벡터로 형질전환된 미생물.



30072216

출력 일자: 2004/10/5

【청구항 37】

제 36항에 있어서,
미생물이 대장균인 것을 특징으로 하는 미생물.

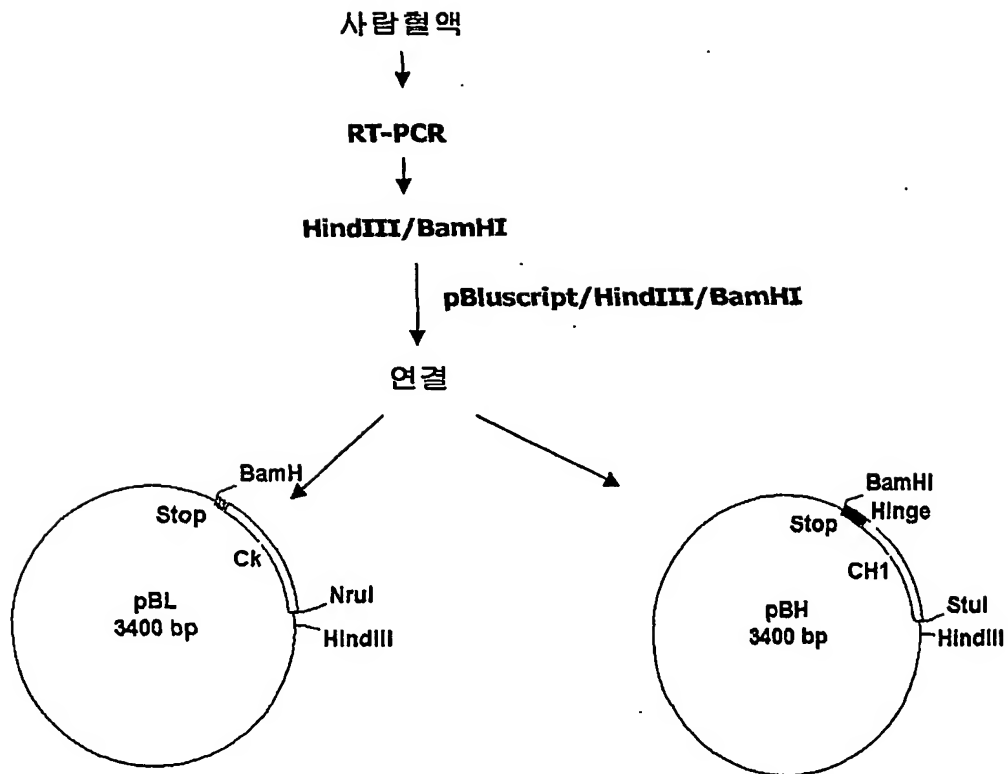
【청구항 38】

제 37항에 있어서,
대장균 BL21(DE3)/psDLHF_B(HM10920) (KCCM-10509), BL21(DE3)/psDLHF_BP(HM10921)
(KCCM-10510), BL21/poDLHF(HM10922) (KCCM-10511), BL21/poDLHF_B/S(HM10923) (KCCM-10512),
BL21/pmsDLHF_N/S(HM10924) (KCCM-10513) 및 BL21/pmsDLHF_S/K(HM10925) (KCCM-10516)로 구
성된 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 미생물.



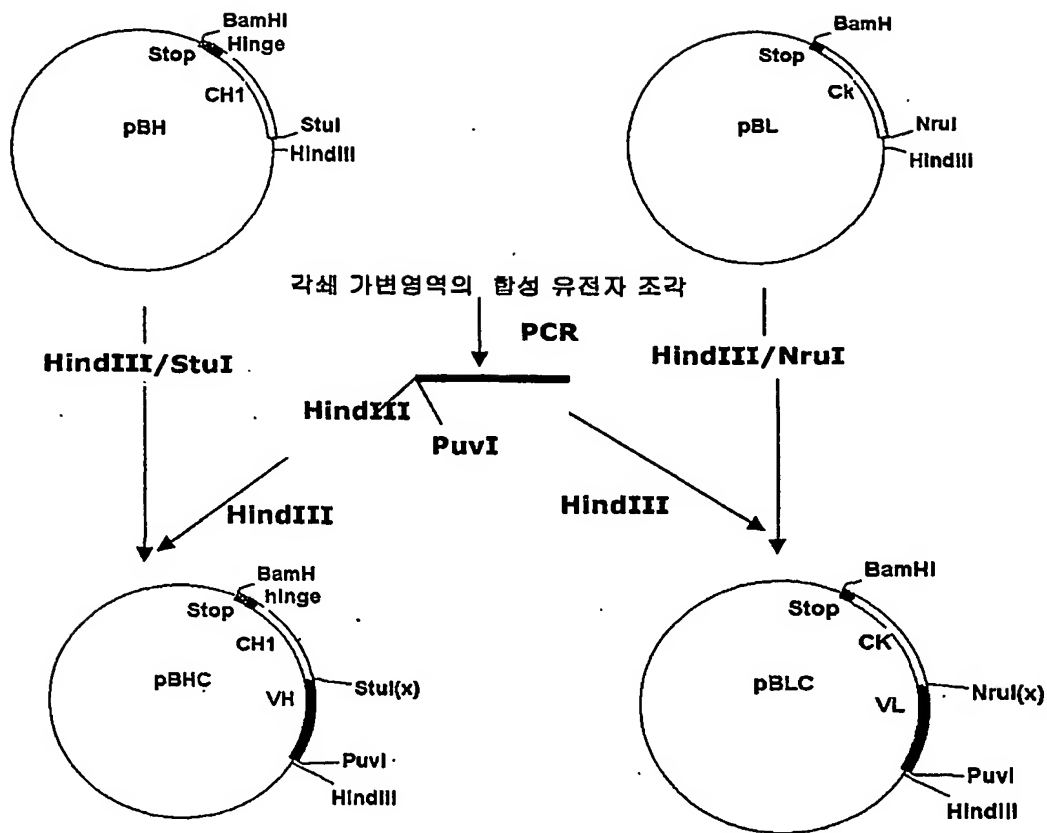
【도면】

【도 1】



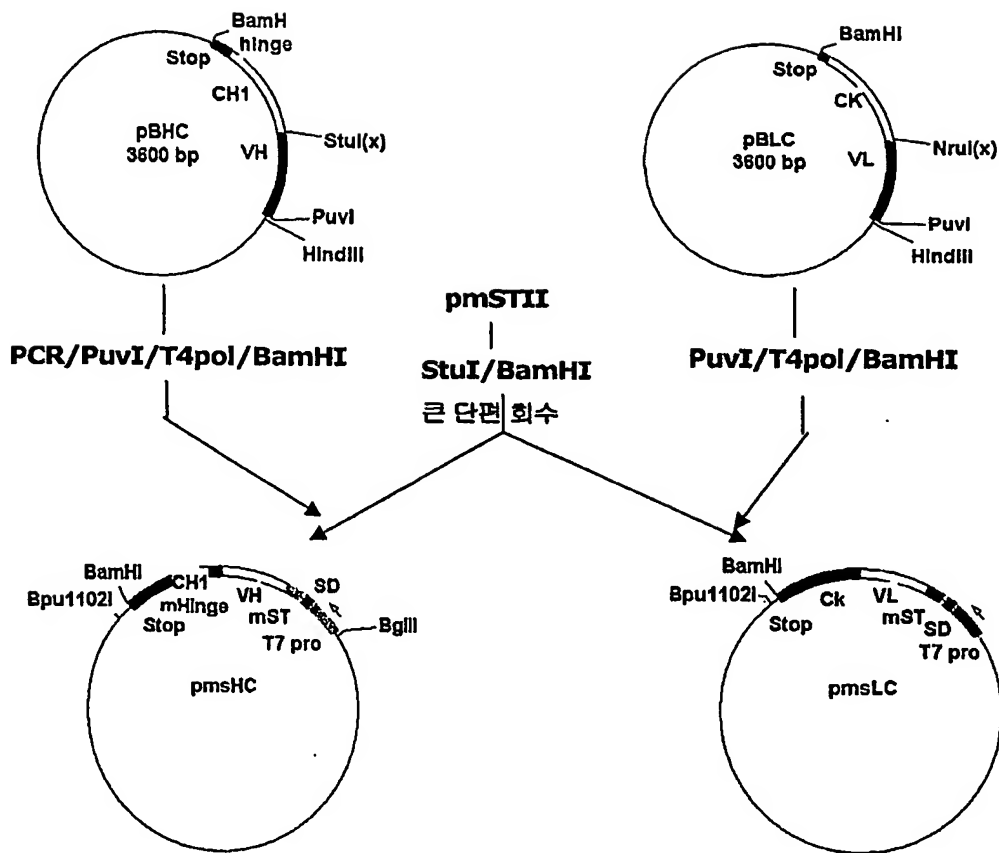


【도 2】

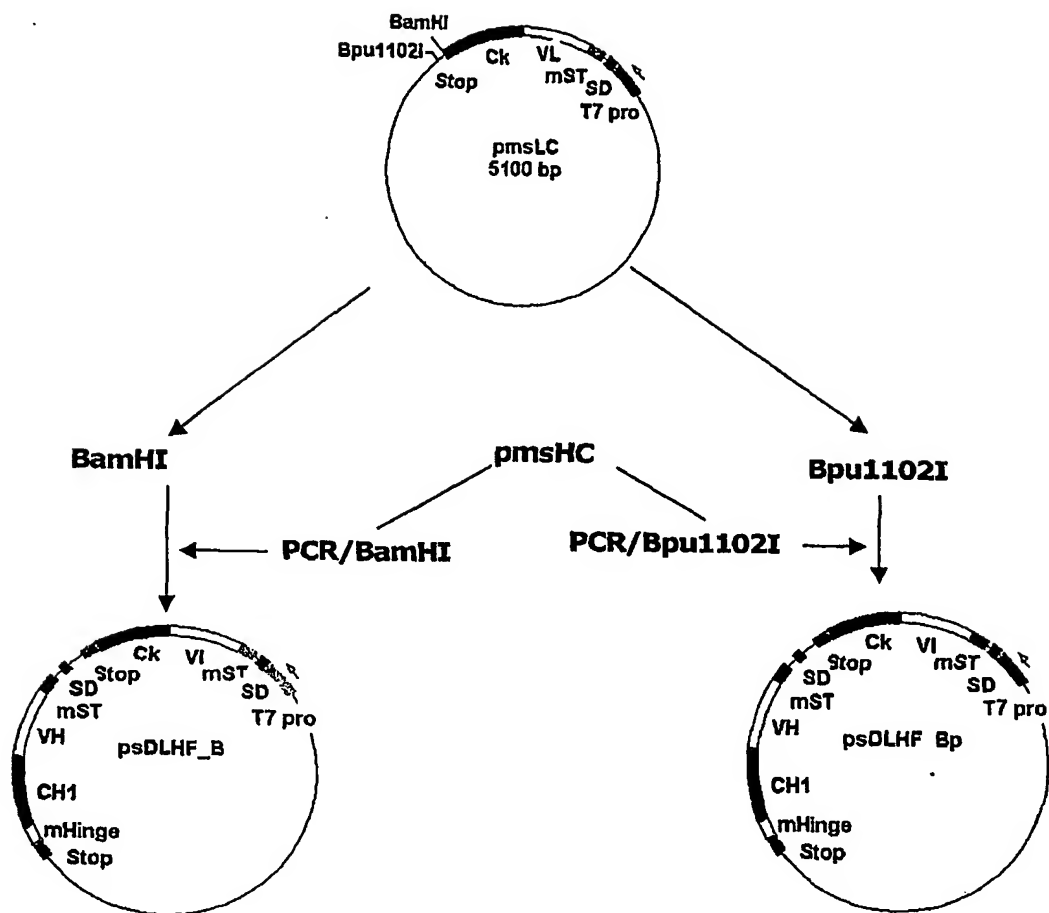




【도 3】



【도 4】

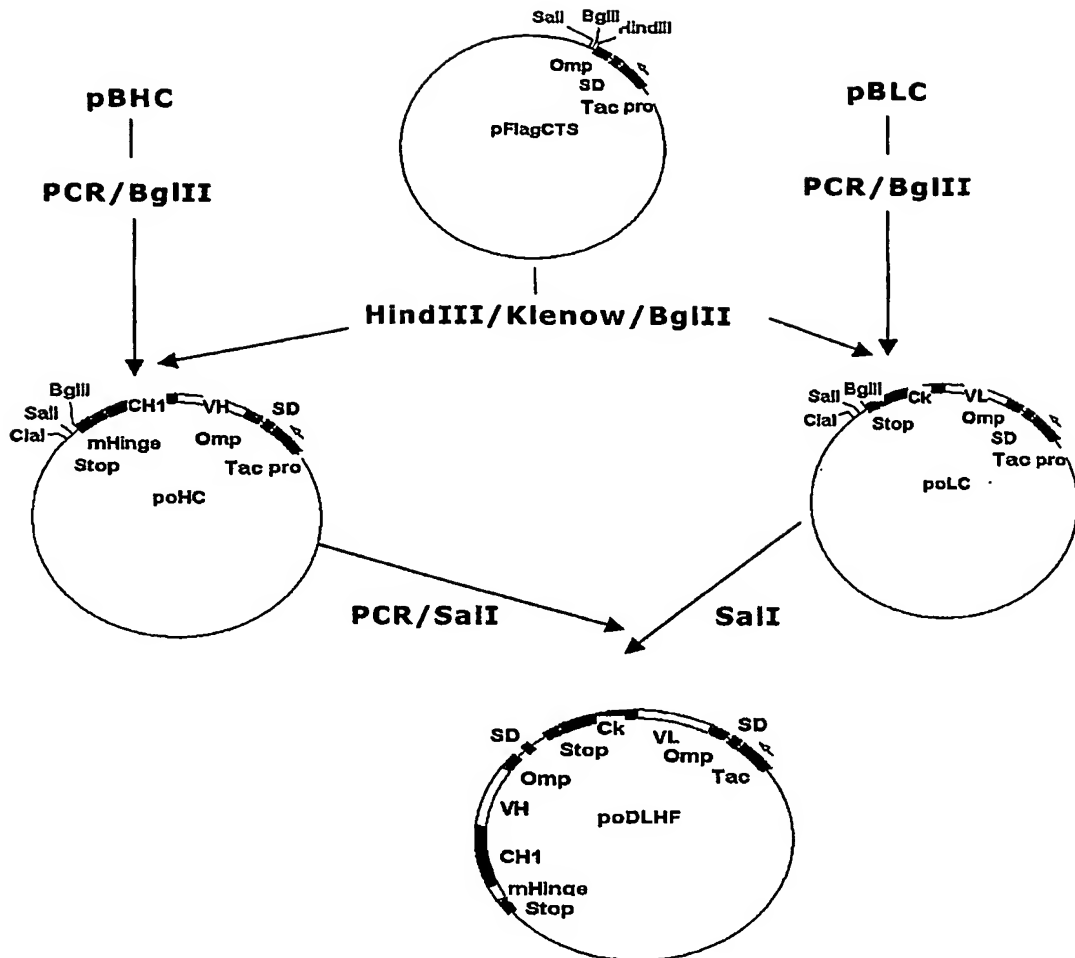




10-2030072216

출력 일자: 2004/10/5

【도 5】

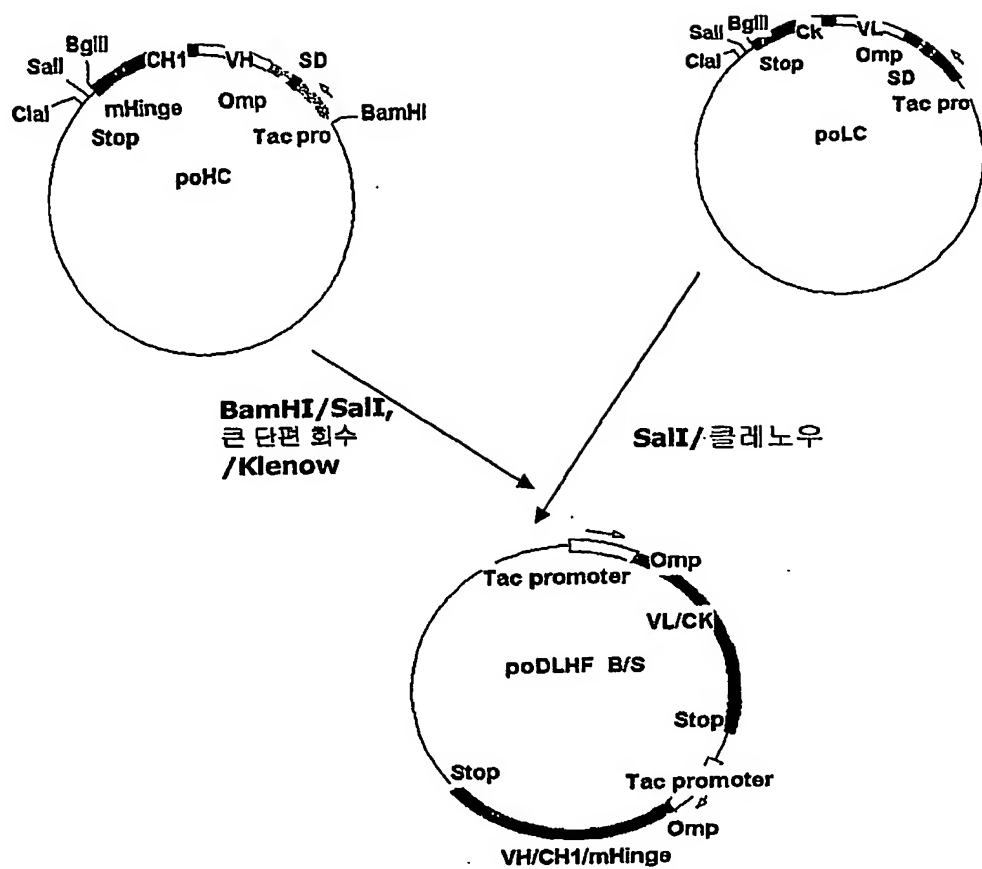




030072216

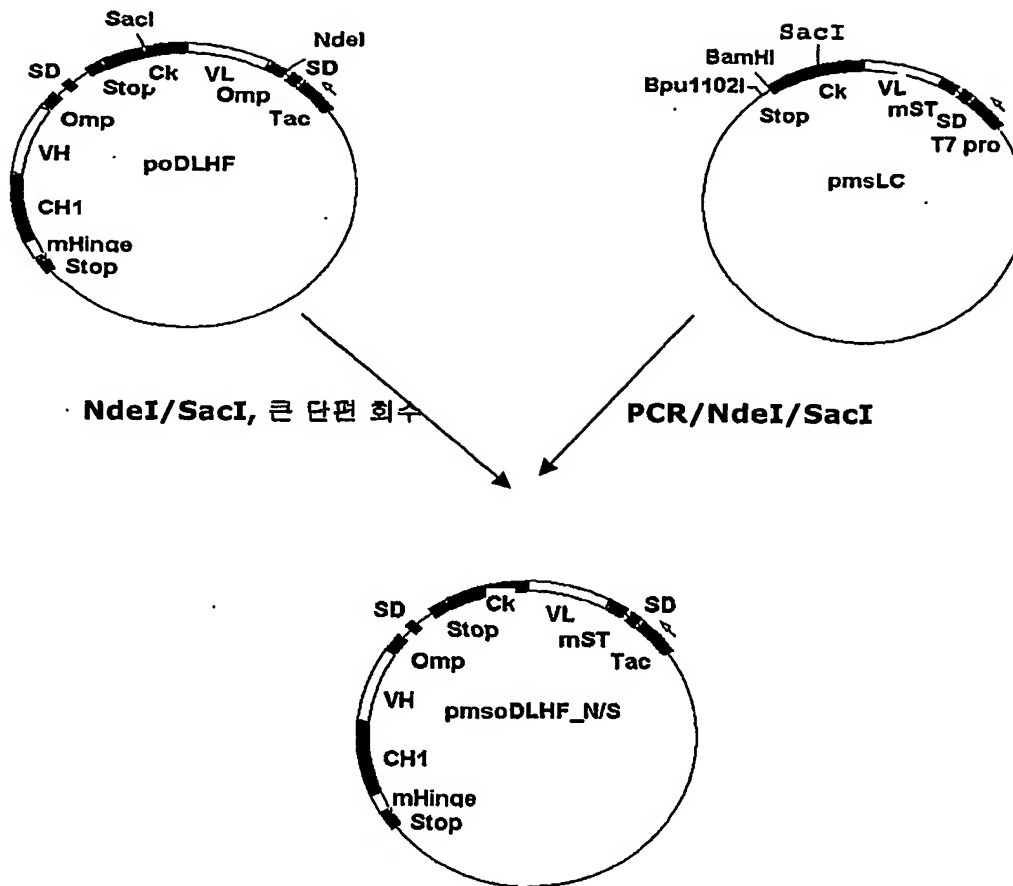
출력 일자: 2004/10/5

【도 6】

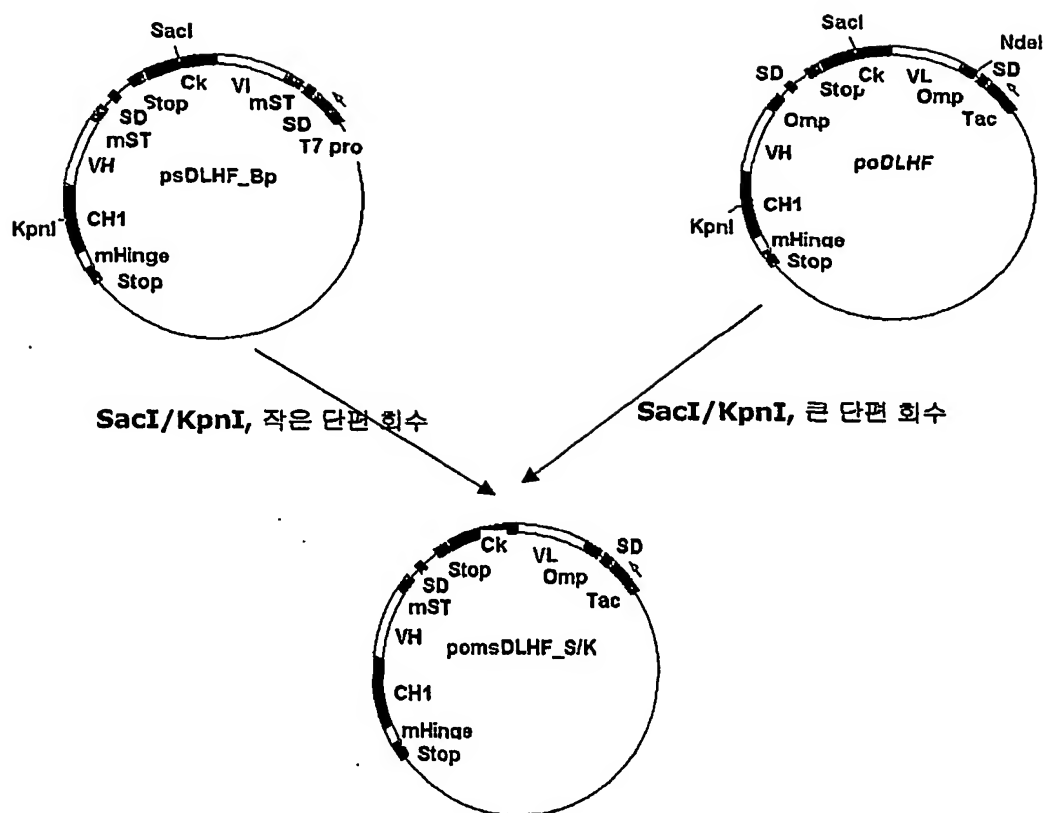




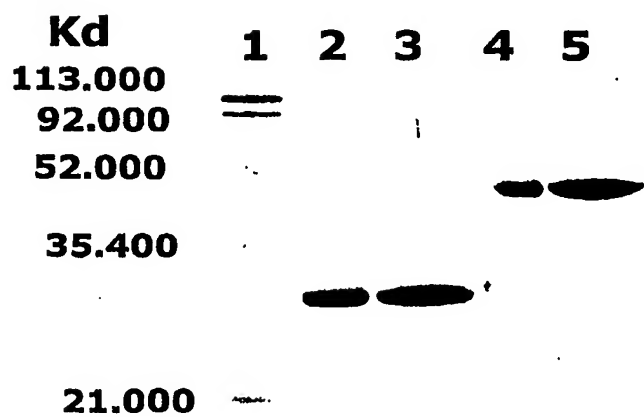
【도 7】



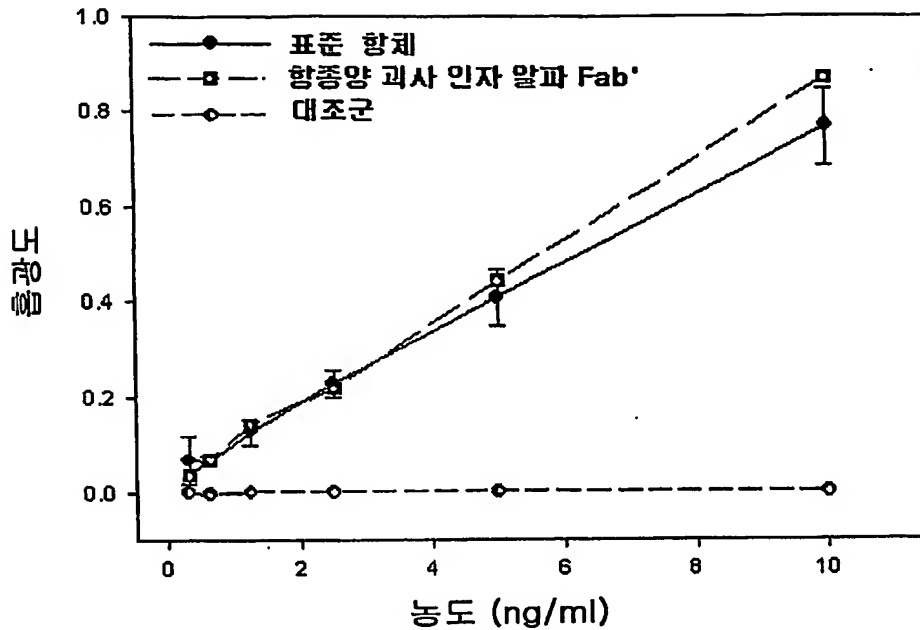
【도 8】



【도 9】



【도 10】



【서열목록】

<110> Hanmi Pharm. Co., Ltd. <120> EXPRESSION VECTOR FOR SECRETING AN ANTIBODY
FRAGMENT USING E. COLI SIGNAL PEPTIDE AND METHOD FOR THE MASS PRODUCTION OF

ANTIBODY FRAGMENT USING SAME <130> FPD/200310-0014 <160> 36 <170> KopatentIr

1.71 <210> 1 <211> 75 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

gene fragment of light chain variable region <400> 1 gggaagcttc gatcggacat

ccagatgacc cagtctccat cctccctgtc tgcattctgta 60 ggggacagag tcacc

75 <210> 2 <211> 80 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

gene fragment of light chain variable region <400> 2 tggtttttgc tgataccagg

ctaagtaatt tctgatgccc tgacttgccc gacaagtgat 60 ggtgactctg tcccctacag

80 <210> 3 <211> 80 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 gene fragment of light chain variable region <400> 3 cctggtatca gcaaaaacca
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt 60 tgcaatcagg ggtcccatct

80 <210> 4 <211> 80 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 gene fragment of light chain variable region <400> 4 aggctgtagg ctgctgatgg
 tgagagtga atctgtccca gatccactgc cactgaaccg 60 agatgggacc cctgattgca

80 <210> 5 <211> 80 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 gene fragment of light chain variable region <400> 5 ccatcagcag cctacagcct
 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg 60 caccgtatac ttttgccag

80 <210> 6 <211> 41 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 gene fragment of light chain variable region <400> 6 tttgatttcc accttgggtcc
 cctggccaaa agtatacggg g 41 <210> 7 <211> 75 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> gene fragment of heavy chain variable
 region <400> 7 gggaagcttc gatcggaggt gcagctggtg gagtctgggg gaggcttggt acagcccggc
 60 aggtccctga gactc 75 <210>

8 <211> 79 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> gene
 fragment of heavy chain variable region <400> 8 agcttgccgg acccagtga tggcataatc
 atcaaaggtg aatccagagg ccgcacagga 60 gagtctcagg gacctgccg

79 <210> 9 <211> 80 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 gene fragment of heavy chain variable region <400> 9 tgcaactgggt ccggcaagct
 ccagggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttga 60 atagtgggtca catagactat

80 <210> 10 <211> 80 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
gene fragment of heavy chain variable region <400> 10 atacagggag ttcttggcgt
tgtctctgga gatggtgaat cggccctcca cagagtccgc 60 atagtctatg tgaccactat

80 <210> 11 <211> 80 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
gene fragment of heavy chain variable region <400> 11 acgccaagaa ctccctgtat
ctgcaaata acagtctgag agctgaggat acggccgtat 60 attactgtgc gaaagtctcg

80 <210> 12 <211> 84 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
gene fragment of heavy chain variable region <400> 12 cactcgagac ggtgaccagg
gtaccttggc cccaatagtc aaggaggagac gcggtgctaa 60 ggtacgagac ttctgcacag taat

84 <210> 13 <211> 39 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
RT-PCR forward primer specific for heavy chain <400> 13 cccaagctta ggccctccacc
aagggcccat cggtcttcc 39 <210> 14 <211> 48 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> RT-PCR reverse primer specific for
heavy chain <400> 14 gggggatcct tatgggcacg gtgggcatgt gtgagttttg tcacaaga

48 <210> 15 <211> 42 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
RT-PCR forward primer specific for light chain <400> 15 cccaagcttt cgcgaactgt
ggctgcacca tctgtcttca tc 42 <210> 16 <211> 42 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> RT-PCR reverse primer specific for
light chain <400> 16 cccggatccc taacactctc ccctgttgaa gctctttgtg ac

42 <210> 17 <211> 69 <212> DNA <213> modified E. coli thermostable
enterotoxin II signal peptide <400> 17 atgaaaaaga caatcgcat tcttcttgca tctatgttcg



ttttttctat tgctacaaat 60 gccagggcg
 69 <210> 18 <211> 45 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 forward primer containing StuI restriction enzyme site <400> 18 tctattgcta
 caaatgccca ggccttccca accattccct tatcc 45 <210> 19 <211>
 45 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer containing
 StuI restriction enzyme site <400> 19 agataacgat gtttacgggt ccggaagggt tggttaaggga
 atagg 45 <210> 20 <211> 51 <212> DNA <213>
 Artificial Sequence <220> <223> reverse primer specific for light chain <400>
 20 gggggatcct cacgcggcgc atgtgtgagt tttgtcaca gatttaggct c 51 <210>
 21 <211> 43 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> forward
 primer containing SD seauence and BamHI restriction enzyme site <400> 21
 gggggatcca ggaggtgatt tatgaaaaag acaatcgcat ttc 43 <210>
 22 <211> 44 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> forward
 primer containing BpuI restriction enzyme site <400> 22 ggggctgagc aggaggtgat
 ttatgaaaaa gacaatcgca tttc 44 <210> 23 <211> 52 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer containing BpuI
 restriction enzyme site <400> 23 ggggctcagc tcacgcggcg catgtgtgag tttgtcaca
 agatttaggc tc 52 <210> 24 <211> 63 <212> DNA <213> E.
 coli OmpA signal peptide <400> 24 atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg
 gtttcgctac cgttgcgcaa 60 gct
 63 <210> 25 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

forward primer specific for heavy chain <400> 25 gaggttcagc tagtcgagtc aggaggcggg

30 <210> 26 <211> 51 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

forward primer containing HindIII and StuI restriction enzyme site <400>

26 gggagatctt cacgcggcgc atgtgtgagt tttgtcaca gatttaggct c 51 <210>

27 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse

primer containing stop codon and BamHI restrciton enzyme site <400> 27

gacattcaaa tgacccagag cccatccagc 30 <210>

28 <211> 42 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> forward

primer containig HindIII and NruI restriction enzyme site <400> 28 cccagatctc

taacactctc ccctgttgaa gctctttgtg ac 42 <210> 29 <211>

41 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer containing

stop codon and BamHI restriction enzyme site <400> 29 ggggtcgaca

ggaggtgatt tatgaaaaag acagctatcg c 41 <210> 30 <211>

51 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer containing

SalI restriction enzyme site <400> 30 ggggtcgact cacgcggcgc atgtgtgagt tttgtcaca

gatttaggct c 51 <210> 31 <211> 42 <212> DNA <213>

Artificial Sequence <220> <223> forward primer specific for modified E. coli

enterotoxin II signal peptide and containing NdeI restriction enzyme site <

400> 31 gggcatatga aaaagacaat cgcatttctt cttgcatcta tg

42 <210> 32 <211> 705 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

TNF-alpha heavy chain <400> 32 gaggttcagc tagtcgagtc aggaggcggg ttggtacagc

ccggcaggctc cctgagactc	60 tcctgtgcgg cctctggatt cacctttgat gattatgcca
tgcactgggt ccggcaagct	120 ccaggggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttggga
atagtgggtca catagactat	180 gcggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca
acgccaagaa ctccctgtat	240 ctgcaaata ga acagtctgag agctgaggat acggccgtat
attactgtgc gaaagtctcg	300 taccttagca ccgcgtcctc ccttgactat tggggccaag
gtaccctgggt caccgtctcg	360 agtgcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac
cctcctccaa gagcacctct	420 gggggcacag cggccctggg ctgcctgggtc aaggactact
tccccgaacc ggtgacgggtg	480 tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct
tcccgggtgt cctacagtcc	540 tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct
ccagcagctt gggcaccag	600 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca
agggtggaaa gaaagttgag	660 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc catag
705 <210> 33 <211>	645 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
TNF-alpha light chain <400>	33 gacatccaga tgaccacgtc tccatcctcc ctgtctgcat
ctgtagggga cagagtcacc	60 atcacttgtc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag
cctggtatca gcaaaaacca	120 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt
tgcaatcagg ggtcccatct	180 cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca
ccatcagcag cctacagcct	240 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg
caccgtatac ttttggccag	300 gggaccaagg tggaatacaa acgaactgtg gctgcacat
ctgtcttcat cttcccgcca	360 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt
gcctgctgaa taacttctat	420 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc
tccaatcggg taactcccag	480 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca



1000030072216

출력 일자: 2004/10/5

```
gcctcagcag caccctgacg      540 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct
gccaagtcac ccatcagggc      600 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag
645 <210>    34 <211>    7 <212>    PRT <213>    TNF-alpha light chain <400>    34
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser   1                5        <210>    35 <211>    8 <212>
PRT <213>    TNF-alpha heavy chain <400>    35 Glu Val Gln Leu Glu Val Asp Ser   1
5        <210>    36 <211>    12 <212>    PRT <213>    N-terminal sequence of
recombinant TNF-alpha <400>    36 Asp Glu Ile Val Gln Met Leu Thr Val Gln Asp Ser   1
5                10
```